

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel de los receptores P2x7 y P2Y<sub>2</sub> en el procesamiento de la APP dependiente de alfascretasa: control de la formación de placas amiloides "in vivo" por el receptor P2X7**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

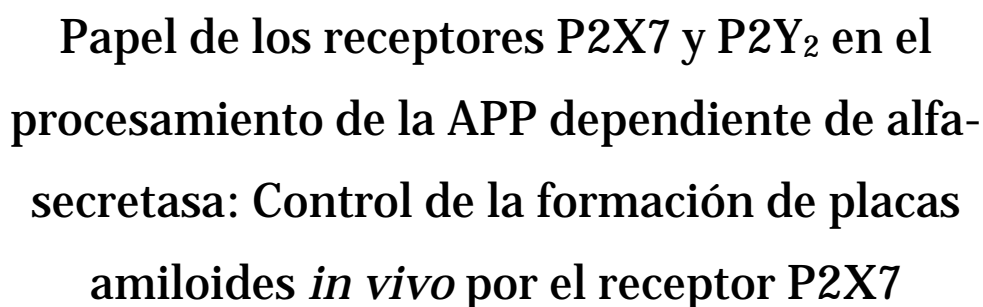
**Miriam León Otegui**

**Directores**

**Francisco Javier Gualix Sánchez**  
**Marías Teresa Miras Portugal**

**Madrid**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA



Miriam León Otegui  
Madrid, 2019

**Directores:** Dr. Francisco Javier Gualix Sánchez  
Dra. María Teresa Miras Portugal





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. MIRIAM LEÓN OTEGUI,  
estudiante en el Programa de Doctorado BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA,  
de la Facultad de VETERINARIA de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Papel de los receptores P2X7 y P2Y2 en el procesamiento de la APP  
dependiente de alfa-secretasa: Control de la formación de placas amiloides  
in vivo por el receptor P2X7.

y dirigida por:

Dr. Javier Quilix Sánchez

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Micas Portugal

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 23 de MAYO de 2019

Fdo.: 



El **Dr. Francisco Javier Gualix Sánchez** y la **Dra. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, respectivamente,

CERTIFICAN:

Que **Miriam León Otegui**, licenciada en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado **"Papel de los receptores P2X7 y P2Y<sub>2</sub> en el procesamiento de la APP dependiente de alfa-secretasa: Control de la formación de placas amiloides *in vivo* por el receptor P2X7"** como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Junio de 2019

**VºBº DIRECTORES**

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal

Dr. Fco Javier Gualix Sánchez

La doctoranda:

Miriam León Otegui



*A mi familia y amigos*





*Una tesis es un camino largo, duro y apasionante que no sería posible recorrer sin el apoyo de cada una de las personas que nos acompañan desde el principio hasta el final. Gracias a todos.*

*En primer lugar, quería agradecer a la Doctora María Teresa Miras Portugal la increíble oportunidad que me dio permitiéndome entrar en este grupo tan maravilloso de científicos locos que forman o han formado parte de sus proyectos a lo largo de los años. Y sobre todo por contagiar esa pasión por la ciencia (empezando por aquellas clases de farmacología en la carrera de Bioquímica) y ser siempre un ejemplo a seguir.*

*Esta tesis tampoco habría sido posible sin la inagotable paciencia y ayuda del Doctor Javier Gualix. No sólo los años que compartimos en el laboratorio, siempre apoyándome, y animándome cuando un experimento no salía como esperábamos, sino sobre todo en estos años posteriores donde sin su cariñosa insistencia sé que habría abandonado hace tiempo. Muchas, muchísimas gracias por todo.*

*También quiero agradecer al resto de profesores del departamento su inestimable ayuda a lo largo de todos estos años: Lola, que siempre nos cuida y quiere a todos; Miguel por todo lo aprendido a su lado y en especial su ayuda con los ratones, Raquel y Esmerilda por sus consejos y buenos ratos compartidos, Magdalena por su cariño incondicional y siempre hacerme sentir bienvenida, Pepe por despertar en mí el interés por la neurología con aquellas clases fantásticas. Y por supuesto Suso, al que nunca olvidaremos. Su gran calidad humana y profesional nos acompañarán a todos para siempre.*

*No puedo olvidarme del resto de personal que hace que nuestras tesis lleguen a buen puerto. Alba, por ser la McGyver de los papeleos y siempre ayudarnos con la mejor de las sonrisas, a Mari Carmen y María Luisa que nos facilitan día a día nuestro trabajo, a todo el personal del animalario sin el cual no podríamos realizar nuestros experimentos y a nuestros conductores sin los cuales transportar a los ratones habría sido bastante menos sencillo.*

*I would also like to thank Prof Dr. Annette Nicke for giving me the chance to spend three amazing months in her laboratory in Frankfurt. Not only did I learn a lot professionally, but I also felt at home and a part of the team since day one. Connie Neblung, Stephen Marino and the rest of the personnel at the Max Planck were also a big part of this, so thank you all.*

*Una de las mejores cosas de mi paso por veterinaria ha sido poder trabajar con los mejores compañeros que alguien pudiera desear. Le agradezco a María estar a mi lado siempre, en lo bueno y en lo malo, desde el principio hasta el fin, y mucho más allá, a Paula por esta increíble amistad a prueba de distancia que tan importante es para mí, a Elvira, su inmenso cariño y seguir ahí, aunque nos separe un océano, a Vero por tantos buenos ratos y risas aseguradas, a Jesús por su infinita paciencia con esos primeros western, por esos abrazos cuando más se necesitan, porque trabajar a su lado es un lujo, y ser su amiga aún más, y por estar siempre pendiente de mí (y de esta tesis), a Patri por ser la mejor compañera, amiga, y maestra (aunque te tomemos el pelo, tus ejemplos siempre nos ayudan). A Felipe por alegrarme siempre el día, a Luz María por ser un ejemplo de constancia, a Nacho por su infinita paciencia y ayuda siempre acompañada de una broma, a Rosa por todos los buenos consejos acompañados de unas risas, a David "culipardi" por su calma y buen humor, a Maibrit porque conocerte ha sido toda una experiencia, a Elena "farmacia" por esos momentos intensos compartidos y a Elenita "frikí" por seguir aguantándome después de tantos años y dejarme formar parte de su vida, donde tanto aprendo y me divierto. Y por supuesto a mis compañeros "del fondo", a Mayka por aquella*

*despedida de veterinaria que tanto me marcó y por tantos, tantísimos momentos inolvidables compartidos (y lo que nos queda), a Ricardo, nuestro científico poeta, por tantas risas a su lado y esa inmensa bondad, a Elena por acompañarme a lo largo de todos estos años (ojalá hubiéramos llegado a la meta juntas), a Carolina, por sus consejos y comprensión, a Salvatore, mi siciliano favorito, por la mejor sonrisa y siempre contagiarme su alegría, a Jorge, por ser nuestro genio loco, a Ana, por su fortaleza y cariño, a David, por ser un gran científico y mejor persona, a Jose, por esa mezcla de fiestero loco y gran persona, y a Andrea por ese sentido del humor que me encanta. No me puedo olvidar de alguien que, sin haber trabajado en Veterinaria, es parte integral de este equipo: Marta. Cuando te conocí en aquella GEN hace mil años pensé “que chica tan maja” y no me puedo creer que tenga la suerte de seguir teniéndote en mi vida tanto tiempo después.*

*También a las nuevas adquisiciones, con las que no he tenido la suerte de trabajar, pero sí de compartir momentos muy divertidos: Aída, Laura, Bea, Ángel y Alberto.*

*Y aunque no nos veamos en el día a día, también quiero agradecer a “los de abajo”, Susi, Darío, María, Isa, Carlos, Ale y Elena, su ayuda en todo lo que pueden y el buen ambiente que comparten.*

*Pero aparte de los que sufren con nosotros día a día en el laboratorio, hay muchas personas que nos escuchan, nos apoyan y nos cuidan desde fuera, dándonos fuerzas para seguir. A Esther y Marta, mi constante incondicional desde que nos conocimos aquel primer día de clase tantos años atrás. Gracias por tantas tardes de crisis, fiestas en el pueblo, noches locas, viajes sorprendentes y mil momentos más que nunca olvidaré. A Borja, no sólo por ser la primera persona que me llevó a un laboratorio de investigación (muchas gracias a Inmaculada y Begoña por acogerme en vuestro laboratorio esos primeros meses) sino también un gran amigo. A Elena, que no sólo me empujaste a ser mejor estudiante y aprovechar más nuestros años en Bioquímicas, sino que te convertiste en una de las mejores amigas que se pueden tener y con la que tantas cosas he compartido. Al resto de mis compis de carrera Jero, Ruth, Alex, Miriam, y todos los demás, entre todos lograsteis que fuera una de las mejores etapas de mi vida. Por supuesto a Luis: un solo año con nosotros en Químicas y una amistad para toda la vida. Gracias por ser la persona con la que más me gusta discutir y que cerca o lejos, sé que siempre está ahí. Gracias también por presentarme a un grupo tan grande de gente increíble sin los que mi vida habría sido muy distinta: a Juanjo por tantas confesiones en el coche a las tantas de la mañana, a Sam por su paciencia infinita y ser de las mejores personas que conozco, a Carlos porque a tu lado todo es una maravillosa aventura, a Ana por ser la mezcla perfecta de juerguista loca y amiga paciente y no faltar jamás en los momentos importantes (aunque hayas salido de cuentas), a Gonzalo y Cristina por tantos años juntos, a Pablo y Antonia por ser un ejemplo de amistad y bondad, y a todos los demás por tantos años de diversión asegurada a vuestro lado. A mis niñas del cole, que aunque nos veamos menos de lo que nos gustaría, siempre estáis ahí y habéis crecido conmigo: a Mary, por formar parte de todos mis buenos recuerdos de la infancia y seguir aquí, a Anna, por no permitir que ni La Haya, Bruselas, Toulouse ni siquiera mi desastrosa relación con el teléfono nos haya separado nunca, a Pati por ser la compañera perfecta para una buena fiesta pero también el mejor hombro sobre el que llorar, a Rosa, por aquellos años tan intensos compartidos, Bruselas y todo lo demás, a Elvira por ser un ejemplo para todas, a Elena, porque a tu lado se aprende algo todos los días, a Marta por esas fiestas de verano en su casa, Elantxobe y tantos otros momentos, y Ana porque siempre que nos vemos parece que no haya pasado el tiempo. A*

*Diego por seguir en mi vida a pesar de la distancia y el tiempo sin vernos. A Jaime, por cumplir su promesa tras aquel reencuentro y retomar esta increíble amistad como si no hubieran pasado los años. A Ayes, por ser tan especial y lo bien que conectamos desde el minuto 1. Por la increíble amistad que compartimos los 4 y que tan importante es para nosotros. A Ana, mi gordita, por aquella llamada unas navidades hace años que me dio la mayor alegría del mundo. Por tantos años juntas compartiendo todo, y el futuro que nos queda por compartir.*

*Y a mi grupo preferido de MIRes y PIRes: Juan, Paula, Karen, Leti, Laura, Bea, Albi por hacerme sentir una más desde el primer momento, y ser un grupo tan diverso e increíble con el que los buenos ratos están asegurados.*

*La parte más fundamental de todo lo que hago y todo lo que soy es mi familia. Gracias a mis padres por TODO. Por ser siempre el mejor ejemplo, por darnos lo mejor, por empujarnos siempre a ser mejores, por estar siempre, siempre, siempre allí, apoyándonos y ayudándonos y siendo nuestra red de seguridad pase lo que pase y por formar la mejor familia que nadie pudiera tener. A vuestro lado siempre me siento segura y feliz. Gracias a mi Big Sis', la mujer a la que siempre aspiré llegar a ser y por la que, aunque me haya quedado a mitad de camino, tanto he aprendido y mejorado. Por siempre cuidar tanto de su Sammy, y convertirme en la hermana pequeña más afortunada del planeta. A mi "hermanito mayor" por ser muchísimo más que un cuñado, por su paciencia y cariño, por tantos planes divertidos y noches de desahogo en vuestra casa, por hacer tan feliz a mi hermana y ser una parte insustituible de nuestra familia. A todos los Otegui por ser una familia diez y a mis yankis, por estar siempre cerca a pesar de los km de distancia. A Jesús y Marisa por cuidarme siempre como una hija más y ser los suegros perfectos, a Juana y Nacho por querer y cuidar tanto a Iciar y ser un ejemplo de padres, y a los mejores sobrinos del mundo: Eva, Iñaki y Juan por su alegría y querer tanto a su prima. Y al resto de la familia Ruberte-Senabre por hacerme sentir siempre como una más.*

*Por último, a mi compañero de viajes desde hace tanto tiempo, Agus. En unas pocas líneas no puedo agradecerte todo lo que me has dado, ni todo lo que tu apoyo incondicional significa para mí. El proyecto que comenzamos juntos hace tanto tiempo es sin duda el más importante y bonito de mi vida, y lo mejor es que no ha hecho más que empezar. A Iciar por ser lo mejor que he hecho en mi vida, por ser tan única, divertida y buena y habernos cambiado la vida de la mejor manera posible. Y a todo lo bueno que queda por venir, ¡estoy impaciente por empezar!*

*Muchas, muchísimas gracias a todos.*

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral para la formación de personal investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. Asimismo, ha contado con la financiación de los proyectos MCyT BFI 2002-03626, CAM (SAL/0551/2004, Fundación la Caixa nº BM05-114-0, MEyC BFU 2005-02079, BFU2008-02699/BFI, la Fundación Marcelino Botín, MEyC Consolider-Ingenio CSD2008\_00005 y UCM-Santander Central Hispano 911585-GR58/08.



# ÍNDICE

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary .....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>11</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>17</b>
<b>1. El sistema purinérgico .....</b>	<b>19</b>
1.1 Los nucleótidos en la neurotransmisión.....	19
1.2 Almacenamiento y liberación de nucleótidos.....	21
1.3 Inactivación ectoenzimática de los nucleótidos .....	24
1.4 Receptores purinérgicos .....	26
1.4.1 Receptores de nucleósidos.....	27
1.4.2 Receptores de nucleótidos.....	28
1.4.2.1 Receptores P2Y .....	28
1.4.2.1.1 El receptor P2Y <sub>2</sub> .....	32
1.4.2.2 Receptores P2X.....	36
1.4.2.2.1 El receptor P2X <sub>7</sub> .....	46
<b>2. Enfermedad de Alzheimer.....</b>	<b>52</b>
2.1 Sintomatología de la Enfermedad de Alzheimer.....	52
2.2 Proteína tau.....	54
2.3 Proteína precursora de amiloide (APP) .....	55
2.3.1 Función de la APP .....	56
2.3.2 Procesamiento de la APP .....	61
<b>3. Proteína GSK-3 .....</b>	<b>73</b>
3.1 GSK-3 y Enfermedad de Alzheimer.....	75
<b>4. Receptores de nucleótidos en la enfermedad de Alzheimer .....</b>	<b>77</b>
4.1 Receptores de nucleótidos en el procesamiento de la APP .....	82
<b>5. Ratones J20 como modelo animal de la enfermedad de Alzheimer .....</b>	<b>83</b>

<b>Objetivos.....</b>	<b>85</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Materiales.....</b>	<b>91</b>
1.1 Instrumentación .....	91
1.2 Reactivos .....	93
1.3 Modelos de estudio.....	96
1.3.1 Cultivos celulares.....	96
1.3.2 Animales.....	96
<b>2. Métodos .....</b>	<b>97</b>
2.1 Estudios de expresión génica .....	97
2.1.1 Obtención de muestras.....	97
2.1.2 Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído .....	99
2.1.3 Reacción de la transcriptasa inversa (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	99
2.1.4 Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real) .....	100
2.2 Transfección transitoria en células de mamífero .....	104
2.2.1 Plásmidos .....	104
2.2.2 Transfecciones transitorias en células de mamífero .....	106
2.3 Técnicas de microfluorimetría: Determinación del Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	107
2.4 Inmunotransferencia .....	110
2.4.1 Extracción de proteínas .....	110
2.4.2 Cuantificación de las proteínas totales.....	111
2.4.3 Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de las membranas .....	112
2.5 Inmunohistoquímica.....	114
2.5.1 Obtención de secciones de cerebro.....	114
2.5.2 Tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebro.....	114
2.6 Inmunofluorescencia.....	115
2.6.1 Inmunofluorescencia en secciones de cerebro .....	115
2.6.2 Inmunofluorescencia en células N2a.....	115
2.7 Tinción de las placas amiloides con tioflavina-T.....	117

2.8	Cuantificación de placas amiloides y células gliales y microgliales .....	118
2.9	Detección de los fragmentos carboxilo terminales (CTFs) de la APP.....	119
2.10	Ensayos de viabilidad celular .....	119
2.11	Ensayos en ratones J20 tratados farmacológicamente.....	120
2.11.1	Tratamiento farmacológico.....	120
2.11.2	Análisis de los niveles de BBG en plasma y cerebro .....	121
2.12	Análisis estadístico de los datos .....	121

## **Resultados ..... 123**

<b>1.</b>	<b>Caracterización de receptores P2 funcionales responsables de la regulación de la actividad <math>\alpha</math>-secretasa en células Neuro-2a. ....</b>	<b>125</b>
1.1.	Caracterización de los fragmentos carboxilo-terminales de la APP en células N2a .....	125
1.2.	Inhibición de la actividad $\alpha$ -secretasa por el receptor P2X7 .....	127
1.3.	Efecto bifásico del BzATP en la actividad $\alpha$ -secretasa en células N2a.....	129
1.4.	El silenciamiento del receptor P2X7 previene el efecto inhibitorio de BzATP sobre la actividad $\alpha$ -secretasa. ....	133
1.5.	El receptor P2Y <sub>2</sub> media el aumento de la actividad $\alpha$ -secretasa inducida por BzATP .....	135
<b>2.</b>	<b>El receptor P2X7 modula la actividad <math>\alpha</math>-secretasa a través de GSK-3.....</b>	<b>139</b>
2.1.	El antagonismo del receptor P2X7 modifica el estado de fosforilación de GSK-3 y la actividad $\alpha$ -secretasa en las células N2a .....	140
2.2.	Modulación de la actividad GSK-3 y $\alpha$ -secretasa por el receptor P2X7 expresado heterológicamente en células HEK.....	142
<b>3.</b>	<b>La inhibición <i>in vivo</i> de P2X7 disminuye las placas amiloides en la Enfermedad de Alzheimer mediante GSK-3 y secretasas.....</b>	<b>144</b>



3.1. El antagonismo <i>in vivo</i> de P2X7 previene la hipofosforilación de GSK-3 observada en los ratones J20 .....	144
3.2. Efecto del tratamiento con BBG en células astrogliales y microgliales .....	150
3.3. El tratamiento con BBG previene el desarrollo de placas amiloides en ratones J20 mediante la regulación de la actividad $\alpha$ -secretasa .....	152
<b>Discusión .....</b>	<b>159</b>
1. Caracterización de dos receptores P2 funcionales responsables de la regulación de la actividad $\alpha$ -secretasa en células Neuro-2a .....	161
2. El antagonismo del receptor P2X7 incrementa la actividad $\alpha$ -secretasa a través de GSK-3 .....	164
3. Efecto de la inhibición de P2X7 sobre las placas amiloides en cerebro .....	166
<b>Conclusiones .....</b>	<b>169</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>173</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## Introducción

Figura 1: Esquema representativo del purinoma .....	21
Figura 2: Modelo estructural de las subunidades P2X humanas .....	38
Figura 3: Modelo estructural de los receptores P2X triméricos .....	40
Figura 4: Localización de algunos polimorfismos de un solo nucleótido no silenciosos en el receptor P2X7 .....	47
Figura 5: Neuropatología principal de la enfermedad de Alzheimer, visualizada al microscopio en corteza cerebral de un paciente .....	53
Figura 6: El APP puede actuar como co-receptor transduciendo diversas señales extracelulares que convergen en quinasas dando lugar a una regulación del citoesqueleto neuronal .....	60
Figura 7: Representación esquemática del procesamiento diferencial de la APP y los diferentes productos obtenidos .....	62

## Materiales y Métodos

Figura 8: Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.....	101
Figura 9: Modelo de las curvas obtenidas en una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real... ..	102
Figura 10: Mapa del plásmido pIRES, eGFP .....	104
Figura 11: Criterios de selección de ARNi y oligonucleótido seleccionado. ....	105
Figura 12: Mapa del plásmido pSuper-neo/GFP y mecanismo de acción de los ARN de interferencia.....	106

Figura 13: Espectros de excitación de la sonda fluorescente para el $\text{Ca}^{2+}$ , Fura-2, en presencia de diferentes concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ .....	107
Figura 14: Esquema representativo del sistema de microfluorimetría.....	109
Figura 15: Cálculo de la relación de fluorescencias a cada tiempo medidas a 340 y 380 nm.....	110

## Resultados

Figura 16: Detección del fragmento carboxilo-terminal de la APP, C83, en células N2a.....	127
Figura 17: Inhibición de la actividad $\alpha$ -secretasa por BzATP en las células N2a.....	128
Figura 18: Estudio de la viabilidad celular de las células N2a N2a .....	129
Figura 19: El BzATP activa dos receptores de nucleótidos diferentes, con efectos opuestos sobre la actividad $\alpha$ -secretasa. ....	130
Figura 20: El antagonista BBG previene el efecto inhibitorio del BzATP sobre la actividad $\alpha$ -secretasa.....	131
Figura 21: La suramina inhibe el efecto estimulador del BzATP sobre la actividad $\alpha$ -secretasa.....	132
Figura 22: Silenciamiento del receptor P2X7 en las células N2a .....	133
Figura 23: El BzATP induce la inhibición de $\alpha$ -secretasa a través de la activación del receptor P2X7.....	134
Figura 24: Incrementos de calcio intracelular inducidos por diferentes agonistas nucleotídicos en las células N2a.....	136
Figura 25: Expresión del receptor P2Y <sub>2</sub> en las células N2a.....	137
Figura 26: La activación del receptor P2Y <sub>2</sub> incrementa la actividad $\alpha$ -secretasa en las células N2a.....	138

Figura 27: Estudio de la viabilidad celular de las células N2a.....	139
Figura 28: Antagonismo del receptor P2X7 por BBG y A438079.....	140
Figura 29: El antagonismo del receptor P2X7 modifica la actividad de GSK-3 y $\alpha$ -secretasa en las células N2a .....	141
Figura 30: Implicación de GSK-3 en la producción del fragmento C83 inducida por la inhibición de P2X7 .....	142
Figura 31: Expresión heteróloga de un receptor P2X7 funcional en células HEK. ....	143
Figura 32: Modulación de la actividad de GSK3 y $\alpha$ -secretasa por el receptor P2X7 expresado heterológamente en células HEK.....	144
Figura 33: Cuantificación de las placas de $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) en el hipocampo de ratones J20 .....	145
Figura 34: El tratamiento con BBG no afecta al peso corporal de los ratones J20 o <i>wild type</i> . ....	146
Figura 35: El tratamiento con BBG modifica el estado de fosforilación de GSK-3 en los ratones J20.....	147
Figura 36: El tratamiento con BBG no modifica la expresión de P2X7 ni su distribución en el hipocampo .....	148
Figura 37: Distribución de p-GSK-3 en el hipocampo de ratones J20 tratados con BBG .....	149
Figura 38: Efecto del tratamiento con BBG en células microgliales .....	151
Figura 39: Efecto del tratamiento con BBG en células astrogiales.....	152
Figura 40: Identificación de los fragmentos C-terminales de la APP, C83 y C99, en el hipocampo de ratones J20 y <i>wild type</i> tratados con PBS o BBG .....	153
Figura 41: El tratamiento con BBG modifica el procesamiento proteolítico de APP en los ratones J20.....	154

Figura 42: El tratamiento con BBG no modifica la expresión de APP en los ratones J20 o <i>wild type</i> .....	155
Figura 43: El tratamiento con BBG reduce el número de placas amiloides en el hipocampo de los ratones J20 .....	156
Figura 44: Cuantificación del número y tamaño de las placas amiloides en ratones J20 tratados con BBG o solución vehículo.....	157

# ÍNDICE DE TABLAS

## Introducción

Tabla 1: Familias de ectonucleotidasas.....	26
Tabla 2: Clasificación de los receptores de adenosina .....	27
Tabla 3: Clasificación de los receptores P2Y .....	31
Tabla 4: Clasificación de los receptores P2X homoméricos .....	45

## Materiales y Métodos

Tabla 5: Relación de los diferentes aparatos utilizados .....	91
Tabla 6: Relación de compuestos y reactivos utilizados .....	93
Tabla 7: Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunotransferencia.....	113
Tabla 8: Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunohistoquímica (IHQ) y en inmunofluorescencia (IF). .....	117



## Abreviaturas

<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	$\alpha$ , $\beta$ -metilén-adenosina-5'-trifosfato
<b>AA</b>	ácido araquidónico
<b>A<math>\beta</math></b>	péptido beta-amiloide
<b>ABC</b>	<i>ATP binding cassette</i>
<b>AD</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>ADAM</b>	Desintegrina y Metaloproteínasa (del inglés <i>A disintegrin and metalloproteinase</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADP</b>	Adenosina-5'-difosfato
<b>AICD</b>	Dominio intracelular de la proteína precursora de amiloide
<b>AKT</b>	Serina/treonina quinasa
<b>AMP</b>	Adenosina-5'-monofosfato
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPc</b>	Adenosina-5'-monofosfato cíclico
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>APH-1</b>	Subunidad APH-1 de la gamma secretasa
<b>APP</b>	Proteína precursora de amiloide
<b>APPL</b>	Proteína precursora de amiloide-like
<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>4</sup> -Di(adenosina-5')tetrafosfato
<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -Di(adenosina-5')pentafosfato
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>BACE1</b>	Beta-secretasa 1
<b>BACE2</b>	Beta-secretasa 2
<b>BBG</b>	Azul brillante G (del inglés <i>Brilliant Blue G</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BzATP</b>	3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosina-5'-trifosfato
<b>CaMK</b>	Calmodulina quinasa
<b>CCD</b>	Cámara con dispositivo de carga acoplada (del inglés <i>charge-coupled device</i> )
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
<b>CTF</b>	Fragmentos carboxilo terminal
<b>Cy3</b>	Cianina tipo 3
<b>DAG</b>	Diacylglicerol
<b>DCC</b>	Receptor DCC de Netrina
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido



<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
<b>EDTA</b>	Ácido etilén-diamino tetraacético
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>E-NPP</b>	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas
<b>E-NTPDasa</b>	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señalización extracelular
<b>FAD</b>	Enfermedad de Alzheimer Familiar
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>GABA</b>	Ácido γ-aminobutírico
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteínas G
<b>GPI</b>	Glicosil fosfatidil inositol
<b>GRK-3</b>	Quinasa de receptores acoplados a proteína G
<b>GSK-3</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3
<b>GTP</b>	Guanosina 5'-trifosfato
<b>hAPP</b>	APP humana
<b>HEK</b>	Células embrionarias de riñón humano
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>Hsp</b>	Proteína de choque térmico
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
<b>ICD</b>	Dominios intracelulares
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>IUPHAR</b>	Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología
<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>KA</b>	Kainato
<b>KN-62</b>	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4fenilpiperazina
<b>KO</b>	Knock out
<b>MAGuK</b>	Guanilato quinasa P55 asociada a membrana
<b>MAP</b>	Proteína asociada a microtúbulos
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MDCK</b>	Células epiteliales de riñón canino Madin-Darby
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NANC</b>	No-adrenérgicos no-colinérgicos
<b>NFT</b>	Ovillos neurofibrilares
<b>NDP</b>	Nucleótido difosfato
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NMP</b>	Nucleótido monofosfato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NTP</b>	Nucleótido trifosfato

<b>oATP</b>	Adenosina-5'- trifosfato oxidado
<b>OCT</b>	<i>Optimal Cutting Temperature Compound</i>
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PEN-2</b>	Subunidad PEN-2 de la gamma secretasa
<b>PFA</b>	<i>p</i> -formaldeído
<b>PI4K</b>	Fosfatidilinositol-4-quinasa
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C (dependiente de Ca <sup>2+</sup> /fosfolípidos)
<b>PKD</b>	Proteína quinasa D
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PPADS</b>	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico
<b>PS</b>	Presenilinas
<b>RGD</b>	Arginina-Glicina-Aspártico
<b>RPTP<math>\beta</math></b>	Tirosina fosfatasa $\beta$
<b>RT</b>	Transcripción inversa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
<b>sAPP</b>	Fragmento soluble de la APP
<b>sAPP<math>\alpha</math></b>	Fragmento soluble $\alpha$ de la APP
<b>sAPP<math>\beta</math></b>	Fragmento soluble $\beta$ de la APP
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>shRNA</b>	Ácido ribonucleico <i>small harpin</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>TACE</b>	Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TGN</b>	Red del trans Golgi
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>TNP</b>	2', 3'-O- (2,4,6-trinitrofenil)
<b>TNAP</b>	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>UDP</b>	Uridina 5'-difosfato
<b>UTP</b>	Uridina-5'-O-(3-trifosfato)
<b>VOCC</b>	Canales de Ca <sup>2+</sup> operados por voltaje
<b>VNUT</b>	Transportador vesicular de nucleótidos
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>



# Summary



## **Title**

Role of P2X7 and P2Y<sub>2</sub> receptors in the  $\alpha$ -secretase-dependent processing of APP: Control of amyloid plaque formation *in vivo* by the P2X7 receptor.

## **Introduction**

ATP exerts fundamental functions at the extracellular level in numerous biological processes through the activation of P2X and/or P2Y purinergic receptors.

One of the pathological characteristics of Alzheimer's disease is the appearance of extracellular neuritic plaques, which are deposits of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) peptides. These peptides are produced by the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein APP.

## **Objectives**

Since purinergic receptors are involved in numerous neurological processes, we tried to elucidate whether they could play a role in the development of neurodegenerative diseases. Specifically, in the processing of APP, a key step in the development of Alzheimer's disease (AD).

## **Results**

The effect of the activation of the P2X7 receptor on  $\alpha$ -CTF C83 levels has been studied using N2a cells as a model. Stimulation of the cells with the P2X7 agonist BzATP led to a reduction of the C83 levels after 2 and 4 hours of incubation. This decrease in C83 levels was due to the activation of a P2X7 type receptor, since the presence of the P2X7 antagonist BBG reversed the inhibitory effect of BzATP.

The effect of different concentrations of BzATP on C83 levels was subsequently studied, this agonist showing a biphasic effect: Low concentrations of BzATP (up to 100 $\mu$ M) induced a reduction in C83 levels, while higher

## Summary

---

concentrations of the nucleotide increased the  $\alpha$ -secretase activity. Given that both the presence of the antagonist BBG and the silencing of P2X7 expression by shRNA only reversed the inhibitory effect of BzATP on C83 levels, without affecting the activatory effect, it seems clear that BzATP, at high concentrations, activates a purinergic receptor other than P2X7 in N2a cells.

The pharmacological characterization of the receptor responsible for the increase of  $\alpha$ -secretase activity revealed that this receptor is equipotently activated by ATP and UTP (UDP being less active), responds to Ap<sub>4</sub>A and Up<sub>4</sub>U and is inhibited by suramin but not by BBG. This pharmacological pattern is compatible with the presence of a P2Y<sub>2</sub> receptor.

Since the modulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) activity by the P2X7 receptor has been described (Díaz-Hernández *et al.*, 2008) and changes in GSK-3 activity modify the production of the A $\beta$  peptide, we wondered if the inhibitory action of the P2X7 receptor on  $\alpha$ -secretase activity could be mediated through GSK-3. Blockade of the P2X7 receptor induced a significant increase in serine 9/21 phosphorylation of GSK-3 enzyme (inactive GSK-3) as well as a significant increase in the product of the  $\alpha$ -secretase,  $\alpha$ -CTF C83. On the other hand, an increase in the production of the C83 fragment was observed in response to the GSK-3 inhibitor SB216763. In contrast, treatment with Bz-ATP caused a significant decrease in the levels of the C83 fragment in N2a cells. The effect of the P2X7 receptor antagonists on  $\alpha$ -secretase activity is mediated through the phosphorylation and inhibition of GSK-3, since this effect is reversed when the cells are transfected with a mutated form of the enzyme that cannot be inhibited by phosphorylation. This effect was corroborated in HEK cells transfected with the P2X7 receptor.

Finally, we analyzed the effect of the *in vivo* inhibition of the P2X7 receptor in J20 mice, a model for the study of early events in familial Alzheimer's disease (FAD) (Mucke *et al.*, 2000). When GSK-3 activity was analyzed by western blot, measuring the ratio between Ser9 phosphorylated GSK-3 and the total levels of the enzyme, a constitutive hypophosphorylation of GSK-3 was observed in the hippocampus of the J20 mice, when compared to control littermates. GSK-3

hypophosphorylation suggests that hyperactivated GSK-3 may contribute to triggering early events in FAD. Sustained *in vivo* inhibition of the P2X7 receptor by the administration of the BBG antagonist prevented the development of amyloid plaques in the hippocampus of the J20 mice. The increase in the levels of phosphorylated GSK-3 together with the increased production of the non-amyloidogenic fragment of the APP in BBG treated J20 mice, confirm that the *in vivo* administration of a P2X7 inhibitor potentiates the  $\alpha$ -secretase activity through GSK-3. Finally, the fact that the inhibition of the P2X7 receptor favours the production of the non-amyloidogenic fragment of the APP, indicates that the reduction in the number and size of the A $\beta$  plaques caused by the treatment with BBG is not due to the direct action of this compound on the amyloid fibers, as previously described for the Congo red dye (Lorenzo and Yankner, 1994, Sánchez *et al.*, 2003). On the other hand, blockade of the P2X7 receptor did not modify either the number nor the morphology of microglial cells in the hippocampus of the J20 mice, so it does not seem probable that the effects of the treatment with BBG in these mice were due to an attenuation of the gliosis and the inflammatory response.



## **CONCLUDING REMARKS**

1. N2a cells possess two types of purinergic receptors, with opposite effects on  $\alpha$ -secretase activity: Activation of the P2X7 receptor causes a reduction in the activity of this enzyme, while activation of the P2Y<sub>2</sub> receptor leads to an increase in the activity of  $\alpha$ -secretase.
2. The pharmacological inhibition of the P2X7 receptor increases the  $\alpha$ -secretase activity, favouring the non-amyloidogenic processing of APP, this effect being mediated through the phosphorylation and inhibition of GSK-3.
3. *In vivo* inhibition of the P2X7 receptor increases the  $\alpha$ -secretase activity and decreases the number and size of amyloid plaques in an animal model of AD (J20 mice).

# **Resumen**



## **Título**

Papel de los receptores P2X<sub>7</sub> y P2Y<sub>2</sub> en el procesamiento de la APP dependiente de alfa-secretasa: Control de la formación de placas amiloides *in vivo* por el receptor P2X<sub>7</sub>.

## **Introducción**

El ATP ejerce funciones fundamentales a nivel extracelular en numerosos procesos biológicos a través de la activación de los receptores purinérgicos P2X y/o P2Y.

Una de las características patológicas de la enfermedad de Alzheimer es la aparición de placas neuríticas extracelulares, que son depósitos de péptidos  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ). Estos péptidos se producen por la escisión proteolítica de la proteína precursora de amiloide APP.

## **Objetivos**

Dado que los receptores purinérgicos están involucrados en numerosos procesos neurológicos, intentamos dilucidar si podrían desempeñar un papel en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Específicamente, en el procesamiento de APP, un paso clave en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA).

## **Resultados**

Se ha estudiado el efecto de la activación del receptor P2X<sub>7</sub> sobre los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 utilizando células N2a como modelo. La estimulación de las células con el agonista de P2X<sub>7</sub> BzATP llevó a una reducción de los niveles de C83 después de 2 y 4 horas de incubación. Esta disminución en los niveles de C83 se debió a la activación de un receptor tipo P2X<sub>7</sub>, ya que la presencia del antagonista de P2X<sub>7</sub> BBG revirtió el efecto inhibitorio del BzATP.

Posteriormente se estudió el efecto de diferentes concentraciones de BzATP en los niveles de C83. Este agonista mostró un efecto bifásico: bajas

concentraciones de BzATP (hasta 100  $\mu$ M) indujeron una reducción en los niveles de C83, mientras que concentraciones más altas del nucleótido aumentaron la actividad  $\alpha$ -secretasa. Dado que tanto la presencia del antagonista BBG como el silenciamiento de la expresión de P2X7 por shRNA solo revirtieron el efecto inhibidor de BzATP sobre los niveles de C83, sin afectar el efecto activador, parece claro que el BzATP, a altas concentraciones, activa un receptor purinérgico distinto del P2X7 en células N2a.

La caracterización farmacológica del receptor responsable del aumento de la actividad  $\alpha$ -secretasa reveló que este receptor es activado de manera equipotente por ATP y UTP (siendo UDP menos activo), responde a Ap<sub>4</sub>A y Up<sub>4</sub>U y es inhibido por suramina pero no por BBG. Este patrón farmacológico es compatible con la presencia de un receptor P2Y<sub>2</sub>.

Dado que la modulación de la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) por el receptor P2X7 ya se ha descrito (Díaz-Hernández et al., 2008) y los cambios en la actividad de GSK-3 modifican la producción del péptido A $\beta$ , nos preguntamos si la acción inhibitoria del receptor P2X7 sobre la actividad de la  $\alpha$ -secretasa podría estar mediada a través de GSK-3. El bloqueo del receptor P2X7 indujo un aumento significativo en la fosforilación de la serina 9/21 de la enzima GSK-3 (GSK-3 inactiva), así como un aumento significativo en el producto de la  $\alpha$ -secretasa,  $\alpha$ -CTF C83. Por otro lado, se observó un aumento en la producción del fragmento C83 en respuesta al inhibidor de GSK-3 SB216763. Por el contrario, el tratamiento con Bz-ATP causó una disminución significativa en los niveles del fragmento C83 en células N2a. El efecto de los antagonistas del receptor P2X7 sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa está mediado a través de la fosforilación e inhibición de GSK-3, ya que este efecto se revierte cuando las células se transfectan con una forma mutada de la enzima que no puede ser inhibida mediante fosforilación. Este efecto fue corroborado en células HEK transfectadas con el receptor P2X7.

Finalmente, analizamos el efecto de la inhibición *in vivo* del receptor P2X7 en ratones J20, un modelo para el estudio de eventos tempranos en la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) (Mucke *et al.*, 2000). Cuando se analizó la actividad de GSK-3 mediante western blot, midiendo la relación entre GSK-3 fosforilada en

Ser9 y los niveles totales de la enzima, se observó una hipofosforilación constitutiva de GSK-3 en el hipocampo de los ratones J20, en comparación con sus hermanos de camada control. La hipofosforilación de GSK-3 sugiere que GSK-3 hiperactivado puede contribuir a desencadenar eventos tempranos en FAD. La inhibición *in vivo*, sostenida en el tiempo, del receptor P2X7 por la administración del antagonista BBG evitó el desarrollo de placas amiloides en el hipocampo de los ratones J20. El aumento en los niveles de GSK-3 fosforilado junto con el aumento de la producción del fragmento no amiloidogénico de la APP en ratones J20 tratados con BBG, confirma que la administración *in vivo* de un inhibidor de P2X7 potencia la actividad  $\alpha$ -secretasa a través de GSK-3. Finalmente, el hecho de que la inhibición del receptor P2X7 favorece la producción del fragmento no amiloidogénico de la APP, indica que la reducción en el número y tamaño de las placas de A $\beta$  causada por el tratamiento con BBG no se debe a la acción directa de este compuesto sobre las fibras amiloides, como ha sido descrito anteriormente para el colorante rojo Congo (Lorenzo y Yankner, 1994; Sánchez *et al.*, 2003). Por otro lado, el bloqueo del receptor P2X7 no modificó el número ni la morfología de las células microgliales en el hipocampo de los ratones J20, por lo que no parece probable que los efectos del tratamiento con BBG en estos ratones se debieran a una disminución de la gliosis y la respuesta inflamatoria.

## **CONCLUSIONES**

1. Las células N2a poseen dos tipos de receptores purinérgicos, con efectos opuestos sobre la actividad de la  $\alpha$ -secretasa: la activación del receptor P2X7 causa una reducción en la actividad de esta enzima, mientras que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> conduce a un aumento en la actividad  $\alpha$ -secretasa.
2. La inhibición farmacológica del receptor P2X7 aumenta la actividad de la  $\alpha$ -secretasa, favoreciendo el procesamiento no amiloidogénico de la APP, este efecto está mediado a través de la fosforilación e inhibición de GSK-3.
3. La inhibición *in vivo* del receptor P2X7 aumenta la actividad de la  $\alpha$ -secretasa y disminuye el número y el tamaño de las placas amiloides en un modelo animal de AD (ratones J20)

# **Introducción**





## **1. EL SISTEMA PURINÉRGICO.**

### **1.1 Los nucleótidos en la neurotransmisión.**

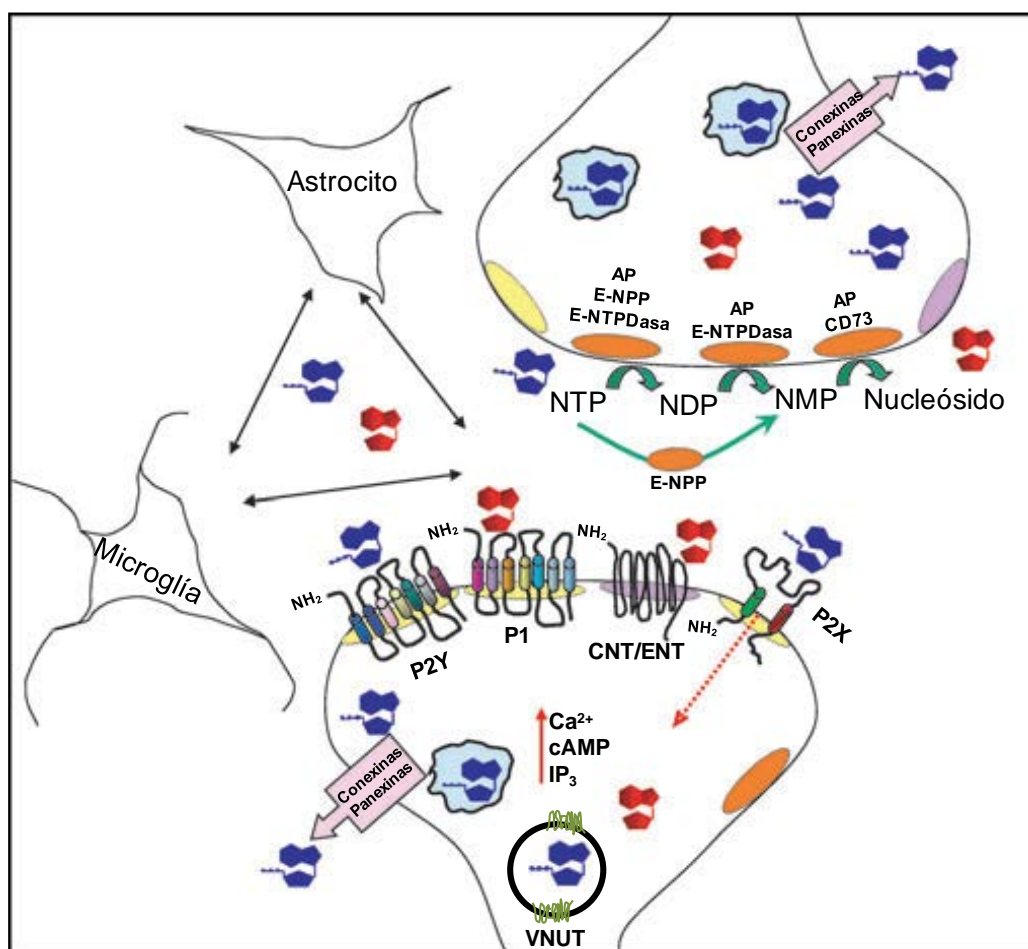
El ATP (adenosina 5'-trifosfato) es una molécula indispensable para el desarrollo de la vida. A nivel intracelular constituye la fuente de energía libre en el metabolismo, colabora en el mantenimiento de gradientes iónicos de membrana, en la regulación enzimática, en la síntesis de macromoléculas o en el trabajo mecánico del movimiento celular. Además, el ATP es el precursor, junto con otros nucleótidos, de los ácidos nucleicos. El hecho de que la molécula de ATP sea incapaz de atravesar por sí misma la membrana plasmática debido a su tamaño y naturaleza iónica, unido a que es rápidamente hidrolizada por las ectonucleotidasas en el exterior de la célula, hicieron pensar que el ATP poseía funciones únicamente intracelulares. Esto provocó un gran retraso en el descubrimiento del importante papel de los nucleótidos como mensajeros extracelulares. Sin embargo, hoy en día se conoce la participación de los nucleótidos, como moléculas de señalización extracelular, en multitud de procesos, entre los que se encuentran la contracción muscular, la secreción endocrina y paracrina, la respuesta inmune e inflamatoria, la agregación plaquetaria, la función cardíaca, y dentro del sistema nervioso, en la transmisión del dolor, neuroprotección, control central de funciones autónomas y modulación de la neurotransmisión (Gordon, 1986; Dubyak y el-Moatassim, 1993; Burnstock, 1997, 2007a)

El diverso rango de actividades extracelulares en las que intervienen las purinas se empezó a conocer con los trabajos de Drury y Szent-Györgyi en 1929 (Drury y Szent-Gyorgyi, 1929), que demostraron que la adenosina y los ácidos adenílicos (AMP, ADP y ATP) extraídos de corazón y músculo liso producían diversos efectos biológicos tales como la vasodilatación de las arterias coronarias y la disminución de la presión arterial. Posteriormente, se describieron acciones sobre otros tejidos y se comenzó el estudio de las acciones del ATP en el sistema nervioso. Sin embargo, pasaron 40 años hasta que se descubrieron unos nervios denominados no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC), que liberaban ATP como neurotransmisor (Burnstock *et al.*, 1970; Burnstock *et al.*, 1972).

En 1983 Jahr y Jessel obtuvieron la primera prueba directa de las acciones extracelulares del ATP en el sistema nervioso central (SNC), al registrar corrientes de entrada en neuronas del asta dorsal de la médula espinal tras la estimulación con ATP (Jahr y Jessell, 1983). Ese mismo año se observó el mismo efecto en neuronas de diversos ganglios sensoriales (Krishtal *et al.*, 1983). Posteriormente se describió la implicación del ATP en la transmisión de sensaciones propioceptivas (Salter *et al.*, 1993) y de señales nociceptivas medulares (Chen *et al.*, 1995). En lo referente a estructuras encefálicas, se registraron por primera vez corrientes postsinápticas excitatorias en cortes de habénula medial (Edwards *et al.*, 1992) y en el hipocampo (Pankratov *et al.*, 1998).

Todo ello indicaba que el ATP debía y debe ser considerado un verdadero neurotransmisor rápido dentro del SNC. Sin embargo, los nucleótidos pueden ejercer también acciones a largo plazo en las neuronas, como diferenciación, crecimiento de neuritas o supervivencia, además de intervenir en procesos patológicos como isquemia, enfermedades neurodegenerativas o trauma cerebral (Burnstock, 2007a, 2008).

Recientemente se ha denominado al complejo molecular responsable de los efectos biológicos de los ligandos extracelulares de purina y pirimidina purinoma (Figura 1) (Volonte y D'Ambrosi, 2009). El purinoma está formado por una gran variedad de ligandos purinérgicos y pirimidinérgicos, receptores purinérgicos P1 (receptores de nucleósidos) y P2 (receptores de nucleótidos), ecto-enzimas del metabolismo de los nucleótidos (ecto-nucleotidasas) y transportadores de nucleósidos y nucleótidos. (Volonte y D'Ambrosi, 2009).



**Figura 1. Esquema representativo del purinoma.** La maquinaria proteica involucrada en la interacción biológica de los ligandos extracelulares de purina y pirimidina: receptores como P2X y P2Y de nucleótidos tri- y di-fosfatos, o receptores de nucleósidos y nucleótidos monofosfato P1; enzimas de hidrólisis de nucleótidos extracelulares, como ecto-nucleótido trifosfo difosfohidrolasas (E-NTPDasas), pirofosfatasas/fosfodiesterasas (E-NPP), ecto-5'nucleotidasa (CD73) y fosfatasas alcalinas (AP); transportadores de nucleósidos (CNT/ENT); transportadores de nucleótidos (VNUT) y canales (conexinas y panexinas). Adaptado de Volonté y D'Ambrosi, 2009.

## 1.2 Almacenamiento y liberación de nucleótidos.

La señalización extracelular mediada por ATP o por cualquier otro nucleótido requiere de la presencia de dichos compuestos en el medio extracelular. En este sentido, se ha descrito que el ATP y otros nucleótidos están presentes en una amplia variedad de vesículas de almacenamiento y secreción, como por ejemplo las vesículas aminérgicas y colinérgicas de los tejidos neurales o neuroendocrinos, o los gránulos de plaquetas y mastocitos (Burnstock, 2007a).

Sin embargo, hasta hace poco tiempo se asumía que la única fuente de ATP extracelular procedía de células dañadas o muertas. Hoy en día está reconocido que la liberación de ATP de células sanas es un mecanismo fisiológico (Bodin y Burnstock, 2001; Lazarowski *et al.*, 2003).

El concepto de cotransmisión fue acuñado en los años 70 y postulaba la idea de que una misma célula nerviosa podía almacenar y liberar diferentes tipos de neurotransmisores. De acuerdo con este concepto, se describió posteriormente el almacenamiento y liberación del ATP en terminales colinérgicas (Richardson y Brown, 1987), noradrenérgicas simpáticas y parasimpáticas (von Kugelgen y Starke, 1991) y GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal (Jo y Schlichter, 1999; Jo y Role, 2002), además de la liberación exocitótica y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del ATP en terminales nerviosas centrales aisladas (Sawynok *et al.*, 1993). Todos estos estudios, unidos a multitud de estudios posteriores, establecen firmemente el concepto de cotransmisión que se conoce en la actualidad (Pankratov *et al.*, 2006).

Además de los nucleótidos clásicos, se conoce una familia de compuestos relacionados estructuralmente con el ATP denominados diadenosina polifosfatos ( $\text{Ap}_n\text{A}$ ). Se trata de sustancias naturales formadas por dos moléculas de adenosina unidas por una cadena de grupos fosfato de longitud variable ( $n = 2-7$ ). Estos dinucleótidos, que también se almacenan en vesículas secretoras, ejercen sus acciones tanto a nivel intracelular como extracelular en el SNC y periférico (Pintor *et al.*, 1993). Se han detectado almacenados en gránulos cromafines de la médula adrenal, junto con el ATP y otros neurotransmisores (Rodríguez del Castillo *et al.*, 1988; Pintor *et al.*, 1991; Pintor *et al.*, 1992). Los diadenosina polifosfatos, principalmente el  $\text{Ap}_4\text{A}$  y el  $\text{Ap}_5\text{A}$ , también se almacenan, junto con el ATP, ADP y GTP, en vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Pintor, 1992). La liberación exocitótica de estos compuestos, junto con el ATP, ha sido descrita en terminales nerviosas de rata (Pintor *et al.*, 1993, 1995). Además se ha demostrado la capacidad del dinucleótido  $\text{Ap}_5\text{A}$  y del ATP de promover la liberación de glutamato, acetilcolina y GABA en terminaciones sinápticas aisladas de cerebro medio de rata, reconociéndose de este modo su importante papel neuromodulador (Díaz-Hernández *et al.*, 2001; Gómez-

Villafuertes *et al.*, 2001; Diaz-Hernandez *et al.*, 2002a; Gomez-Villafuertes *et al.*, 2003; Gualix *et al.*, 2003; Diaz-Hernandez *et al.*, 2004a; Gomez-Villafuertes *et al.*, 2004).

El hecho de que los nucleótidos y dinucleótidos de adenina se almacenen en el interior de vesículas de secreción, alcanzando concentraciones mucho mayores de las que se encuentran en el citoplasma celular (>100 mM frente a 2-5 mM, en el caso del ATP), pone de manifiesto la necesidad de un sistema de transporte activo específico. Hasta hace muy poco se conocían algunas características funcionales y cinéticas de dicho transportador, como la baja especificidad que permitía el transporte de una gran variedad de nucleótidos, o su comportamiento mnemónico (Gualix *et al.*, 1997; Gualix *et al.*, 1999), pero la proteína responsable del transporte no se había identificado. En 2008, Sawada y cols. presentaron evidencias de la actuación de la proteína SLC17A9 como transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). Se trata de una isoforma de la familia de los transportadores SLC17 con 12 segmentos transmembrana y 430 aminoácidos. Esta proteína ha sido identificada tanto en humano como en ratón fundamentalmente en el cerebro y en la médula adrenal, donde juega un papel vital en el almacenamiento y liberación de nucleótidos (Sawada *et al.*, 2008).

Además de lo anteriormente mencionado existen múltiples evidencias obtenidas en diversos tipos celulares, como células endoteliales, musculares y gliales, que señalan la existencia de una liberación de ATP no exocitótica en respuesta a estímulos como hipoxia, inflamación, daño tisular o estrés mecánico (Bodin y Burnstock, 2001).

Los mecanismos de liberación no exocitótica de nucleótidos de adenina no están totalmente identificados, aunque se ha propuesto que podrían estar mediados por una serie de transportadores o canales que forman parte de la superfamilia de proteínas ABC ("ATP-binding cassette"). Otras hipótesis señalan la posible participación de canales iónicos dependientes de voltaje, conexinas, panexinas y otros miembros de las uniones estrechas entre células (Buettner *et al.*, 2000; Bahima *et al.*, 2006; Eltzschig *et al.*, 2006). Tampoco podemos olvidar que el UTP, UDP y UDP-glucosa son compuestos funcionales en el Golgi y el

grupo del Dr. Boucher ha propuesto su salida mediante exocitosis constitutiva como excedente de la funcionalidad del Golgi (Lazarowski, 2006).

### **1.3 Inactivación ectoenzimática de los nucleótidos.**

Como todos los neurotransmisores, los nucleótidos deben ser inactivados, degradados o retirados del medio extracelular para evitar su acción prolongada. Así, una vez en la hendidura sináptica, son rápidamente hidrolizados por unas enzimas extracelulares específicas denominadas ectonucleotidasas. Como consecuencia de esta hidrólisis los nucleótidos van perdiendo secuencialmente sus grupos fosfato, generando diferentes metabolitos, que pueden mediar sus propias acciones en el exterior celular, hasta dar lugar, como último paso de su degradación, a los correspondientes nucleósidos precursores (Harkness, 1968; Miki *et al.*, 1986), que a su vez pueden actuar como ligandos fisiológicos de sus propios receptores purinérgicos.

Las ectonucleotidasas están formadas por varias familias de enzimas que se pueden diferenciar gracias a sus propiedades funcionales y moleculares. Varían en su preferencia y afinidad por el sustrato, en el producto formado, la dependencia de cationes y el pH óptimo catalítico. Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos y actúan de forma concertada o consecutiva formando cascadas de hidrólisis. Normalmente se encuentran ancladas a la membrana celular con su dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular, aunque también se han descrito formas solubles liberadas al medio (denominadas exonucleotidasas) a partir de vesículas sinápticas o, como la ecto-5'-nucleotidasa, como resultado de la hidrólisis de su anclaje a la membrana (Todorov *et al.*, 1997). Además, existen evidencias de la multifuncionalidad de estas enzimas, pudiendo actuar también en procesos de adhesión celular o en funciones de receptores transmembrana. (Zimmermann *et al.*, 2007)

Las ectonucleotidasas se clasifican en las siguientes familias (Tabla 1):

**Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas).** También se conocen como ecto-ATPasas, ecto-ADPasas, ecto-apiratasas o CD39. Esta familia está formada por 8 miembros, de los cuales sólo las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 se localizan en la superficie celular. Los restantes miembros de la familia se

localizan en orgánulos intracelulares, aunque también se han descrito formas secretadas de las NTPDasas 5 y 6. Las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 son proteínas con dos hélices transmembrana y un dominio extracelular largo portador del sitio catalítico (Bigonnesse *et al.*, 2004; Robson *et al.*, 2006). Hidrolizan nucleósidos tri- y difosfatos, generando los correspondientes monofosfatos, aunque los ratios de hidrólisis varían considerablemente entre las cuatro enzimas (Kukulski *et al.*, 2005).

**Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPP).** Esta familia de enzimas está formada por siete miembros, que han sido numerados como NPP1 a NPP7 de acuerdo con el orden en el que fueron clonados, pero solamente tres de ellos, NPP1, NPP2 y NPP3, son capaces de hidrolizar nucleótidos. Con la única excepción de NPP2, que solo existe como proteína secretada, estas enzimas son proteínas ancladas a membrana por un único segmento transmembrana, con el extremo catalítico orientado hacia el espacio extracelular. NPP1, 2 y 3 se caracterizan porque comparten un pH óptimo catalítico alcalino con las fosfatasas alcalinas. Estas enzimas hidrolizan enlaces 5'-monodiester en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de nucleósidos 5'-monofosfato (Goding *et al.*, 2003; Stefan *et al.*, 2005). También pueden hidrolizar otros compuestos, como los diadenosina polifosfatos, liberando AMP y el correspondiente nucleótido  $Ap_{n-1}A$  (Vollmayer *et al.*, 2003).

**Ecto-5'-nucleotidasa.** También se la conoce como CD-73. Es una proteína dimérica de unión a zinc, anclada a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol (GPI), que hidroliza los nucleósidos monofosfato generando los respectivos nucleósidos. Es decir, cataliza la etapa final de la cadena de hidrólisis de los nucleótidos. Se encuentra ampliamente distribuida entre los diferentes tejidos (Zimmermann, 1996, 2000).

**Fosfatasas alcalinas.** Estas enzimas forman homodímeros y poseen tres cationes en cada sitio catalítico. Liberan el fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos e hidrolizan nucleósidos 5'-tri-, -di- y -monofosfato, generando los correspondientes nucleósidos (Millan, 2006). Las cuatro isoformas de la familia, placentar, intestinal, de células germinales y no específica de tejido (TNAP),



poseen un pH óptimo alcalino y se encuentran ancladas a la membrana plasmática gracias a un glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Ogata *et al.*, 1988).

**Tabla 1. Familias de ectonucleotidasas.** Tomado de Robson *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2007.

Ecto-Nucleotidasas		Reacción catalizada	Inhibidores
<i>Familia Ecto-NTPDasa</i>			
	<i>Preferencia de sustrato</i>		
NTPDasa 1 (CD39)	NTP ~ NDP	<b><i>NTP → NMP + 2Pi</i></b>	ARL 67156; 8-BuS-ATP; polioxometalatos; antagonistas receptores P2.
NTPDasa 2 (CD39L1)	NTP >>> NDP		
NTPDasa 3 (CD39L3)	NTP >NDP		
NTPDasa 8	NTP >NDP		
		NDP → NMP + Pi	
<i>Familia Ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas</i>			
NPP1, NPP2, NPP3		NTP, NDP → NMP	Antagonistas receptores P2; heparina; heparán sulfatos.
		Dinucleósido polifosfatos → NMP + N <sub>p-1</sub>	
		NAD <sup>+</sup> → AMP + nicotinamida mononucleótido	
		UDP-glucosa → UMP + Glucosa-6-fosfato	
<i>Ecto-5'-nucleotidasa</i>		<b><i>NMP → Nucleósido + Pi</i></b>	AOPCP
<i>Fosfatasa alcalina</i>			
TNAP			
Placental Intestinal De células germinales		<b><i>NTP → NDP → AMP → Nucleósido + 3Pi</i></b>	<b><i>Levamisole</i></b> L-homoarginine  L-fenilalanina

## 1.4 Receptores purinérgicos

El concepto de neurotransmisión purinérgica lleva implícito la existencia de unos receptores purinérgicos específicos. En 1978 Burnstock propuso la

subdivisión de los receptores purinérgicos en dos tipos: los receptores nucleosídicos o de adenosina P1, y los receptores de nucleótidos P2 (Burnstock 1978).

### 1.4.1 Receptores de nucleósidos.

Hasta la fecha se han clonado y caracterizado cuatro tipos de receptores específicos de adenosina, denominados inicialmente receptores P1. Actualmente se los conoce como: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Olah y Stiles, 2000; Fredholm *et al.*, 2001; Yaar *et al.*, 2005). Todos ellos poseen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G, modulando la actividad de la adenilato ciclasa principalmente. Existen varios agonistas y antagonistas específicos de los distintos subtipos de receptor que se muestran en la Tabla 2 (Burnstock, 2007b). Estos receptores pueden mediar diversos efectos fisiológicos como modulación del sistema cardiovascular, inmune y nervioso (Ledent *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2001). A modo de ejemplo, en nuestro grupo se demostró que la activación de los receptores presinápticos de adenosina modulaba la respuesta a dinucleótidos en terminales nerviosos de cerebro de rata (Díaz-Hernández *et al.*, 2000; Díaz-Hernández *et al.*, 2002b).

**Tabla 2. Clasificación de los receptores de adenosina.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Fredholm *et al.*, 2001; Burnstock, 2007b.

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
A <sub>1</sub>	CCPA, CPA S-ENBA, CVT-510	DPCPX, N-0840 MRS1754, WRC-0571	G <sub>i/o</sub> ↓AMPc ↑IP <sub>3</sub>	Cerebro, médula espinal, testículos, corazón, terminales nerviosas autónomas
A <sub>2A</sub>	CGS 21680 HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261 ZM241385, K2 6002	G <sub>s</sub> ↑AMPc	Cerebro, corazón, pulmón, bazo
A <sub>2B</sub>	NECA (no selectivo)	Enprofilina, MRE2029-F20 MRS17541, MRS 1706	G <sub>s</sub> ↑AMPc G <sub>q/11</sub> ↑IP <sub>3</sub>	Intestino grueso, vejiga
A <sub>3</sub>	IB-MECA, 2-Cl-IB-MECA DBXRM, VT160	MRS1220, L-268605 MRS1191, MRS1523 VUF8504	G <sub>i/o</sub> G <sub>q/11</sub> ↓AMPc ↑IP <sub>3</sub>	Pulmón, hígado, cerebro, testículos, corazón

### **1.4.2 Receptores de nucleótidos.**

Los receptores específicos de nucleótidos, o receptores P2, se dividen en dos familias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbracchio y Burnstock, 1994). Hasta la fecha, en mamíferos se han clonado y caracterizado farmacológicamente siete subunidades diferentes que constituyen los receptores P2X (P2X1-P2X7). Por su parte, los receptores P2Y cuentan con ocho miembros (P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) (Burnstock, 2007b). La nomenclatura empleada en esta Tesis Doctoral tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge *et al.*, 2009).

La identificación y caracterización farmacológica de los receptores P2 no es tarea sencilla. La falta de disponibilidad de agonistas y antagonistas específicos y potentes para diferenciar bien los distintos subtipos hace que se produzca solapamiento de las respuestas obtenidas en sistemas que coexpresan varios subtipos de receptores. Además, las ectonucleotidasas presentes pueden degradar o transformar los compuestos utilizados. Por lo tanto, aunque haya sido posible encontrar en los tejidos nativos receptores análogos a algunos de los receptores P2 clonados (coincidiendo en la distribución, mecanismos de señalización y farmacología), en la mayoría de los casos no se ha podido establecer una correspondencia inequívoca. Por este motivo se tiende a calificar a los receptores endógenos con el sufijo anglosajón “-like” (“P2X<sub>1</sub>-like”, “P2Y<sub>2</sub>-like”, etc.) hasta que se apliquen criterios posteriores que corroboren su identificación.

#### **1.4.2.1 Receptores P2Y.**

Los receptores P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G pertenecientes a la familia de los receptores de rodopsina clase A. Su estructura consta de siete segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares. El extremo N-terminal se orienta hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal posee una orientación intracelular. Actualmente la familia consta de ocho subtipos clonados

y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Abbracchio *et al.*, 2006; Burnstock, 2007b). Los receptores P2Y se expresan a lo largo de todo el organismo (ver Tabla 3), mediando por sí mismos o modulando multitud de funciones, aunque a día de hoy solamente unos pocos efectos fisiológicos mediados por estos receptores han sido confirmados fuera de toda duda (Fischer y Krugel, 2007).

### **Señalización intracelular mediada por receptores P2Y.**

Los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular. Por un lado, los receptores P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> están acoplados principalmente a la fosfolipasa C (PLC), a través de una proteína G<sub>q/11</sub> insensible a toxina pertúsica. Como resultado del acoplamiento a la PLC/IP<sub>3</sub>, los receptores P2Y producen incrementos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> mediante la salida de calcio de reservorios intracelulares y activan la proteína quinasa C (PKC) en las células que los expresan, activando así numerosas cascadas de señalización secundarias (Erb *et al.*, 2006), como la cascada de las MAP quinasas (MAPK) en astrocitos (Delicado *et al.*, 2005) y plaquetas (García *et al.*, 2007). Los receptores P2Y clonados recientemente, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, parecen estar relacionados mayoritariamente con la disminución de los niveles de AMPc, por su acoplamiento a una proteína sensible a la toxina pertúsica G<sub>i/o</sub>, aunque el P2Y<sub>13</sub> y el P2Y<sub>14</sub> pueden, de modo adicional, producir incrementos de la concentración de calcio intracelular (Abbracchio *et al.*, 2006; Erb *et al.*, 2006). Además, nuestro grupo ha descrito recientemente la inhibición dependiente de AKT de la glucógeno sintasa quinasa GSK-3 y la translocación nuclear de su sustrato, β-catenina, en neuronas granulares de cerebelo de rata, fenómeno que parece estar mediado por el receptor P2Y<sub>13</sub> (Ortega *et al.*, 2008).

Además de todas estas vías de señalización, en el sistema nervioso los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como los canales dependientes de voltaje de Ca<sup>2+</sup> o K<sup>+</sup>, los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vanilloides (Lechner y Boehm, 2004; Abbracchio *et al.*, 2006).

### **Características farmacológicas y distribución de los receptores P2Y en el sistema nervioso.**

Farmacológicamente, los receptores P2Y se pueden clasificar atendiendo a la afinidad que muestran frente a los nucleótidos de adenosina y uridina. Aunque estas respuestas varían en potencia dependiendo de las especies, los receptores P2Y pueden dividirse en tres grupos. El primero está formado por los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub>, que son activados únicamente por nucleótidos de adenina (ATP/ADP). Otro grupo lo forman receptores activados tanto por nucleótidos de adenina como de uracilo (receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>), y por último el P2Y<sub>6</sub>, que es específico para pirimidinas. Un caso especial es el del P2Y<sub>14</sub>, activado por UDP-glucosa y por otros UDP-azúcares (Abbracchio *et al.*, 2006; von Kugelgen, 2006; Burnstock, 2007b). La Tabla 3 resume las características farmacológicas de los subtipos de la familia P2Y clonados hasta el momento.

Estos receptores tienen una amplia distribución en todo el organismo (ver Tabla 3). Concretamente, en el sistema nervioso central, se ha descrito la expresión de la mayoría de los subtipos conocidos, mediando funciones muy importantes, como la regulación de la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores o la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración. En el cerebro humano se expresan abundantes niveles de ARNm de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub> en comparación con otros tejidos. El P2Y<sub>1</sub> se expresa principalmente en corteza, cerebelo, hipocampo y ganglios basales (Moore *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001). Por el contrario, únicamente son detectables niveles bajos o moderados del mensajero de los receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> en cerebro humano (Moore *et al.*, 2001). El receptor P2Y<sub>12</sub> se localiza preferentemente en células gliales (Hollopeter *et al.*, 2001), al igual que el P2Y<sub>14</sub>, descrito en líneas de astrocitos y microglía (Fumagalli *et al.*, 2003). Por último se ha descrito la presencia del receptor P2Y<sub>13</sub> en cerebelo, hipocampo, tálamo, sustancia nigra o núcleo caudado (Communi *et al.*, 2001).

**Tabla 3.- Clasificación de los receptores P2Y.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de von Kugelgen y Wetter, 2000; Moore *et al.*, 2001; Abbracchio *et al.*, 2003; King y Townsend-Nicholson, 2003; von Kugelgen, 2006; Burnstock, 2007b

Receptor	Potencia de agonistas (EC <sub>50</sub> )	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
P2Y <sub>1</sub>	2MeSADP>ADPβS>2MeSATP=ADP >ATP UTP, UDP inactivos Ap <sub>3</sub> A>Ap <sub>2</sub> A	MRS 2279>MRS 2179> Suramina> PPADS	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Plaquetas, cerebro, placenta, próstata, endotelio, corazón, músculo esquelético, tracto digestivo, células gliales, osteoclastos.
P2Y <sub>2</sub>	ATP≈UTP>Ap <sub>4</sub> A ADP, UDP y 2MeSATP inactivos	Suramina>Azul reactivo 2, ARC126313	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; G <sub>0</sub> , G <sub>12</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Músculo esquelético, epitelio respiratorio, hueso, pulmón, pituitaria, endotelio de microvasculatura coronaria, bazo, linfocitos, osteoblastos, riñón.
P2Y <sub>4</sub>	UTP>UTPγS>>ATP, UDP (agonistas parciales) UTP=ATP=Ap <sub>4</sub> A (rata)	PPADS Azul reactivo 2 (rata)>Suramina	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; G <sub>i/0</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Intestino, cerebro, pituitaria, placenta, corazón, pulmón, músculo liso vascular, células endoteliales.
P2Y <sub>6</sub>	UDPβS >UDP >UTP>ADP>2MeSATP	Azul Reactivo 2 >PPADS>Suramina, MRS2578	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Placenta, bazo, riñón, corazón, aorta, intestino, cerebro, timo, pulmón
P2Y <sub>11</sub>	ATPγS ≈BzATP>ATP>2MeSATP	Suramina > Azul reactivo 2, NF157, 5'-AMPs	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> y G <sub>s</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Activación AC	Cerebro, placenta, pituitaria, intestino, sistema inmune, granulocitos.
P2Y <sub>12</sub>	2MeSADP=2MeSATP>>ADP>>ATP UTP, UDP inactivos	AR-C69931, AR-C66096, Clopidogrel, Ticlopidina, Azul Reactivo 2, Suramina, 2MeSAMP, CT50547, AZD6140, INS49266, PSB0413, PPADS inactivo, BzATP (rata)	G <sub>i</sub> Inhibición AC Activación RhoA	Plaquetas humanas, cerebro.
P2Y <sub>13</sub>	2MeSADP≥2MeSATP>ADP>> ATP UTP, UDP inactivos	AR-C69931>PPADS>Suramina 2MeSAMP MRS2211	G <sub>i/0</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Inhibición AC Activación RhoA	Bazo, cerebro, células gliales, médula ósea, ganglios linfáticos endotelio.
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucosa>UDP-galactosa>UDP-Glucurónico>UDP-N-acetilglucosamina ATP, ADP, UTP, UDP inactivos		G <sub>i/0</sub> Activación PLC	Placenta, adiposo, estómago, intestino, cerebro, bazo, corazón, pulmón.

#### **1.4.2.1.1 El receptor P2Y<sub>2</sub>**

El receptor P2Y<sub>2</sub>, previamente llamado P2U, cuyo gen se localiza en el cromosoma 11 (11q13.4) humano, ha sido clonado y caracterizado farmacológicamente de células o tejido de humano, rata, ratón, perro y cerdo (Lustig *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1994; Bowler *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Zambon *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2004).

Los receptores P2Y<sub>2</sub> son activados completamente por cantidades equivalentes de ATP y UTP, mientras que el ADP y el UDP han mostrado ser agonistas mucho menos efectivos de este tipo de receptores (Lustig *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1994; Lazarowski *et al.*, 1995). Una excepción es el P2Y<sub>2</sub> porcino que es relativamente insensible al ATP (Shen *et al.*, 2004). Se ha visto que el análogo no hidrolizable de UTP, UTPγS, es un agonista muy potente del receptor P2Y<sub>2</sub> (Lazarowski *et al.*, 1996). Asimismo, ensayos de expresión heteróloga han demostrado que el receptor P2Y<sub>2</sub> murino y de rata puede ser estimulado por BzATP (Erb *et al.*, 1993; Wildman *et al.*, 2003). Además de los nucleótidos trifosfato, el receptor P2Y<sub>2</sub> puede ser activado también por dinucleótidos tetrafosfato, como el Ap<sub>4</sub>A o el Up<sub>4</sub>U. (Patel *et al.*, 2001; Pendergast *et al.*, 2001). Mientras que la suramina actúa como un antagonista competitivo en receptores P2Y<sub>2</sub> humanos y de rata (Charlton *et al.*, 1996; Wildman *et al.*, 2003), otros ligandos ampliamente utilizados para inhibir receptores purinérgicos, como el PPADS, el reactivo azul 2 o el TNP-ATP, han mostrado ser antagonistas muy débiles del receptor P2Y<sub>2</sub> (Wildman *et al.*, 2003).

Los receptores P2Y<sub>2</sub> pueden unirse directamente a PLCβ1 a través de la proteína Gα<sub>q/11</sub> para mediar la producción de IP<sub>3</sub> y diacilglicerol (DAG), dos segundos mensajeros en la liberación de calcio desde reservorios intracelulares y en la activación de PKC, respectivamente. La unión de receptores P2Y<sub>2</sub> a otros subtipos de proteínas G también ha sido descrita (Baltensperger y Porzig, 1997; Murthy y Makhlouf, 1998; Weisman *et al.*, 1998; Bagchi *et al.*, 2005). En algunos sistemas, las respuestas mediadas a través del receptor P2Y<sub>2</sub> son parcialmente sensibles a la toxina pertúsica, un inhibidor de la proteína G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, y existen estudios que indican que el acceso a la proteína G<sub>o</sub> depende de la asociación del receptor

P2Y<sub>2</sub> con integrinas  $\alpha\text{v}\beta 3/\beta 5$  (Erb *et al.*, 2001), siendo esta interacción importante en la regulación de la quimiotaxis inducida por nucleótidos (Bagchi *et al.*, 2005).

La expresión del ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> ha sido detectada en músculo esquelético humano, corazón, cerebro, bazo, linfocitos, macrófagos, médula ósea y pulmón, con niveles de expresión más bajos detectados en hígado, estómago y páncreas (Moore *et al.*, 2001). También hay expresión de receptores P2Y<sub>2</sub> funcionales en epitelio, músculo liso, células endoteliales y en leucocitos, cardiomiocitos, osteoblastos y células derivadas del sistema nervioso central incluyendo células de Schwann, neuronas corticales de rata, oligodendrocitos, asta dorsal y astrocitos corticales, astrocitos inmortalizados, células de astrocitoma y células híbridas NG108-15xglioma (Bowler *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995; Kirischuk *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1995; Berti-Mattera *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996; Kunapuli y Daniel, 1998; Weisman *et al.*, 1999; Pillois *et al.*, 2002; Seye *et al.*, 2002; Gendron *et al.*, 2003; Kumari *et al.*, 2003).

Se ha empleado mutagénesis dirigida del receptor P2Y<sub>2</sub> para demostrar que la sustitución de los aminoácidos cargados positivamente en las hélices transmembrana 6 y 7 por aminoácidos neutros disminuye la potencia del ATP y el UTP, lo que sugiere que estos dominios juegan un papel importante en la unión de los agonistas nucleotídicos (Erb *et al.*, 1995). El receptor P2Y<sub>2</sub> sufre desensibilización inducida por agonista en varios tipos celulares (Wilkinson *et al.*, 1994; Garrad *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 2000; Velázquez *et al.*, 2000; Santiago-Pérez *et al.*, 2001). Estudios de mutagénesis indican que la delección de motivos estructurales en el dominio C-terminal intracelular, que contiene sitios putativos de fosforilación por las quinasas de receptores acoplados a proteínas G, disminuye la desensibilización inducida por agonista y la internalización del receptor P2Y<sub>2</sub> (Garrad *et al.*, 1998). El receptor P2Y<sub>2</sub> también posee el motivo consenso de unión a integrinas Arg-Gly-Asp (RGD) en su primer bucle extracelular, que facilita la colocalización del receptor con integrinas  $\alpha\text{v}\beta 3/\beta 5$  cuando el receptor P2Y<sub>2</sub> es expresado en células de astrocitoma humano 1321N1 carentes del receptor endógeno (Erb *et al.*, 2001). Un receptor P2Y<sub>2</sub> mutante en el que se sustituyó el motivo RGD con una secuencia que no tiene mucha afinidad por las integrinas, Arg-Gly-Glu, mostró una EC<sub>50</sub> para la movilización de calcio



inducida por nucleótido aproximadamente 1000 veces mayor que el receptor nativo (Erb *et al.*, 2001). Se sabe que las integrinas  $\alpha\beta3/\beta5$  regulan la angiogénesis y las respuestas inflamatorias durante la proliferación celular, migración, adhesión e infiltración (Zhang *et al.*, 2002; Hutchings *et al.*, 2003; Kannan, 2003; Li *et al.*, 2003; Pidgeon *et al.*, 2003), respuestas que también son mediadas a través de la activación de receptores P2Y<sub>2</sub> (Wilden *et al.*, 1998; Seye *et al.*, 2002; Greig *et al.*, 2003a,b; Schafer *et al.*, 2003; Bagchi *et al.*, 2005; Kaczmarek *et al.*, 2005) lo que sugiere que los nucleótidos pueden transactivar la cascada de señalización de las integrinas mediante la unión del receptor P2Y<sub>2</sub> a integrinas. También se ha visto que la secuencia RGD juega un papel independiente de integrinas dirigiendo al receptor a la membrana apical de células epiteliales de riñón canino (MDCK) (Qi *et al.*, 2005).

La activación de receptores P2Y<sub>2</sub> aumenta la síntesis y/o la liberación de ácido araquidónico (AA), prostaglandinas y óxido nítrico (NO) (Lustig *et al.*, 1992; Pearson *et al.*, 1992a, b; Xing *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2002, 2003; Welch *et al.*, 2003). En cultivos primarios de astrocitos murinos, los receptores P2Y<sub>2</sub> median la activación de ERK1/2 y PKCs tanto dependientes como independientes de calcio, que a su vez pueden activar la fosfolipasa A2 citosólica, dando lugar a la producción de AA (Gendron *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003), el precursor de eicosanoides, prostaglandinas y leucotrienos (Balsinde *et al.*, 2002). La activación de receptores P2Y<sub>2</sub> en corazones de rata perfundidos con UTP o ATP induce una vasodilatación pronunciada a través de la secreción dependiente de endotelio de NO y prostaciclina (Lustig *et al.*, 1992; Pearson *et al.*, 1992a, b). La expresión del P2Y<sub>2</sub> en células de músculo liso se ve aumentada por agentes que median la inflamación, incluyendo interleuquina Il-1 $\beta$ , interferón  $\gamma$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Hou *et al.*, 1999, 2000) y se ha visto que este aumento en la expresión de P2Y<sub>2</sub> promueve la activación inducida por nucleótidos de PKC, ciclooxigenasa y MAPK (Koshiba *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 1998; Seye *et al.*, 2002). La activación de P2Y<sub>2</sub> puede inducir la fosforilación de las quinasas activadas por estrés JNK y p38 (Gendron *et al.*, 2003) y también el aumento de la expresión de genes que regulan la supervivencia celular dependiente de p38 y ERK1/2 en células de astrocitoma humano (Bcl-2 y Bcl-xl) y de genes que regulan el crecimiento neurítico en células

PC-12 (Chorna *et al.*, 2004). Se ha visto que los receptores humanos P2Y<sub>2</sub> regulan la degranulación de neutrófilos inducida por fibrinógeno, independiente de metabolitos de AA (Meshki *et al.*, 2004), y se ha sugerido que estos receptores puedan jugar un papel importante en el proceso de cicatrización (Burrell *et al.*, 2003; Greig *et al.*, 2003a, b).

Hay estudios que indican que la activación de MAPK mediada por P2Y<sub>2</sub> en fibroblastos Rat-1 y en células PC12 es dependiente de la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a través de una cascada dependiente de Src/Pyk2 (Soltoff, 1998; Soltoff *et al.*, 1998). Esto contrasta con estudios que han empleado fibroblastos embrionarios derivados de ratones Src<sup>-/-</sup>, Pyk2<sup>-/-</sup> o Src<sup>-/-</sup>Pyk2<sup>-/-</sup> para demostrar que Src y Pyk2 son esenciales para la transactivación mediada por GPCR de EGFR, pero no para la activación de MAPK activada por GPCR (Andreev *et al.*, 2001). Se ha visto que las subunidades Gβγ regulan la transactivación mediada por Src de receptores de factores de crecimiento (Luttrell *et al.*, 1997), lo cual puede ser una cascada común ya que los GPCRs estimulan la proliferación celular. Otros estudios han identificado dos dominios SH3 (es decir dominios PXXP en los que P es Prolina y X es cualquier aminoácido) en el dominio C-terminal intracelular del P2Y<sub>2</sub> humano que son necesarios para la transactivación de los receptores de los factores de crecimiento epidérmico o derivado de plaquetas (PDGF) por parte de ATP o UTP (Liu *et al.*, 2004). La delección de estos dominios SH3 inhibe la colocalización inducida por nucleótidos del receptor P2Y<sub>2</sub> con EGFR y la transactivación inducida por UTP de EGFR (es decir, su fosforilación) pero no suprimió la activación de ERK1/2 cuando los receptores mutantes fueron expresados en células de astrocitoma 1321N1 (Liu *et al.*, 2004), probablemente debido a la capacidad del receptor P2Y<sub>2</sub> para activar también directamente Src y ERK1/2 a través de las vías de señalización de PLC e integrinas (Erb *et al.*, 2001). Además, Src coinmunoprecipitó con el receptor P2Y<sub>2</sub> en células tratadas con UTP que expresaban el receptor P2Y<sub>2</sub> nativo, pero no en las que expresaban el receptor que presentaba la delección del dominio SH3 (Liu *et al.*, 2004), lo cual sugiere que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> promueve la unión de Src a los sitios SH3 del P2Y<sub>2</sub>, lo que facilita la activación de Src.

La activación de receptores P2Y<sub>2</sub> provoca multitud de respuestas celulares en diversos tejidos. En sistema nervioso central inducen la proliferación de astrocitos dependiente de ERK en varias situaciones, incluyendo lesiones y trauma (Neary *et al.*, 1994, 1996, 1999, 2003; Franke *et al.*, 1999). También pueden inducir el procesamiento dependiente de  $\alpha$ -secretasa de la proteína precursora de amiloide (APP) en células de astrocitoma (Camden *et al.*, 2005) pudiendo ser una posible diana farmacológica para enfermedades neurodegenerativas (una descripción más detallada del papel de los receptores purinérgicos en el procesamiento de la proteína APP se dará en la sección 4.1).

En conjunto, los estudios realizados sobre el receptor P2Y<sub>2</sub> y sus vías de señalización han identificado posibles dianas farmacológicas para aterosclerosis, inflamación, fibrrosis quística, osteoporosis, cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

### **1.4.2.2 Receptores P2X.**

Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática que se activan por la unión del ATP extracelular y una vez activados permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>) (North, 2002). Se expresan en todo el organismo, mediando multitud de procesos que van desde la transmisión sináptica hasta la coagulación sanguínea. Tienen un papel destacado en la transmisión sináptica rápida entre neuronas y en la transmisión neuromuscular en el músculo liso (Edwards *et al.*, 1992; Sneddon *et al.*, 2000). Hasta la fecha se han identificado siete subunidades P2X diferentes, denominadas P2X1 a P2X7, que se ensamblan en forma de canales homo- o heterotriméricos (Nicke *et al.*, 1998; Vial *et al.*, 2004b). También han sido identificados los genes que codifican para cada subunidad. Tanto la subunidad P2X4 como la P2X7 se localizan en el mismo cromosoma (brazo largo del cromosoma 12 humano), al igual que les ocurre a las subunidades P2X1 y P2X5 (brazo corto del cromosoma 13). Sin embargo, el resto de las subunidades se localizan en cromosomas diferentes. El descubrimiento de nuevas isoformas de estas subunidades ha aumentado la diversidad de esta familia de receptores. Cabe destacar, por ejemplo, las isoformas identificadas como consecuencia del

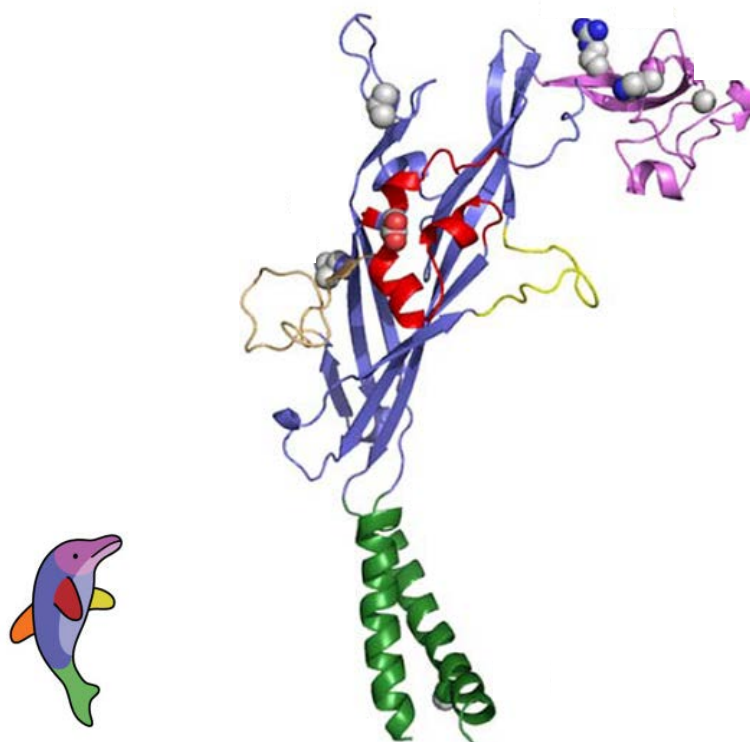
procesamiento diferencial en cerebelo de rata, cóclea y pituitaria, del receptor P2X<sub>2</sub> (Simon *et al.*, 1997; Housley *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 1999). Aunque la mayoría de las variantes no son capaces de formar canales activos por sí mismas, su expresión en los tejidos pone de manifiesto la posibilidad de que la heterogeneidad de los receptores P2X *in vivo* sea mayor de la esperada.

### **Características estructurales y oligomerización.**

Los receptores P2X constituyen una familia estructuralmente bien diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (North, 1996). Las subunidades P2X varían entre los 379 aminoácidos de la subunidad P2X<sub>6</sub> a los 595 de la subunidad P2X<sub>7</sub>. Poseen dos regiones transmembrana (TM1 y TM2) y extremos N- y C-terminal citosólicos, con motivos de unión a proteínas quinasas. Mientras que el extremo N-terminal tiene un tamaño uniformemente corto (24-31 aa) en todas las subunidades, el extremo C-terminal es muy variable en secuencia y tamaño: muy corto en los receptores P2X<sub>1</sub>, 3, 4 y 6, intermedio en los P2X<sub>2</sub> y 5 e inusualmente grande en la subunidad P2X<sub>7</sub>, con más de 200 aa y un dominio hidrofóbico extra. Este hecho sugiere que el extremo carboxilo-terminal podría conferir propiedades específicas a cada receptor. Por otro lado, entre el 50% y el 70% de la estructura de estas subunidades lo forma un bucle extracelular situado entre los dos segmentos transmembrana. Este dominio posee alrededor de 280 aminoácidos, 93 de los cuales se encuentran altamente conservados en, al menos, seis de las siete subunidades P2X (Vial *et al.*, 2004b).

Recientemente, Gouaux y su grupo han descrito la arquitectura de los receptores P2X basándose en la cristalización de la estructura del receptor P2X<sub>4</sub>. Como se muestra en la Figura 2, cada subunidad presenta una estructura en forma de delfín con las hélices transmembrana y la región extracelular semejantes a la cola y el cuerpo, respectivamente (Kawate *et al.*, 2009). La arquitectura central del cuerpo extracelular está caracterizada por dos dominios de lámina  $\beta$  que otorgan rigidez y resistencia a cambios conformacionales. El dominio de la cabeza se define por tres láminas  $\beta$  antiparalelas y una hélice  $\alpha$  (Kawate *et al.*, 2009). En esta región extracelular se encuentran también altamente conservados 10

residuos de cisteína que forman series de puentes disulfuro y de esta manera contribuyen a la estabilización de la estructura terciaria (Ennion y Evans, 2002), así como numerosos sitios de glicosilación, necesarios para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y para la regulación de la potencia del ligando



**Figura 2. Modelo estructural de las subunidades P2X humanas.** Los colores en la estructura de la subunidad P2X representan las diferentes partes del delfín: en verde la cola, en azul el cuerpo, la cabeza en rosa, la aleta dorsal en naranja y las aletas laterales en rojo y amarillo. Adaptado de Kawate *et al.*, 2009.

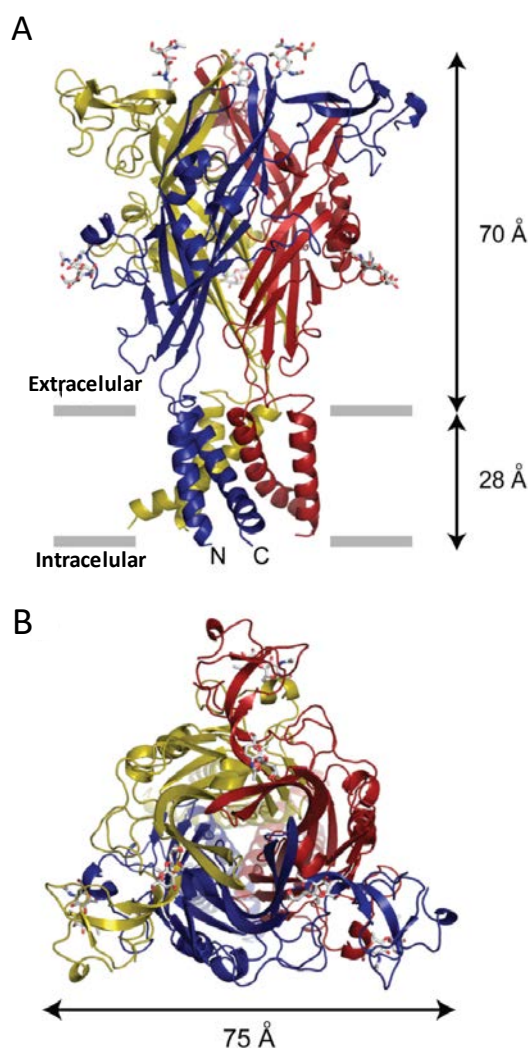
Los dos segmentos transmembrana (TM) que presentan las subunidades P2X no son capaces, por sí mismos, de formar un poro iónico, motivo por el que las distintas subunidades se asocian como homo- o heterotrímeros para formar un canal funcional (Nicke *et al.*, 1998; Aschrafi *et al.*, 2004; Nagaya *et al.*, 2005) (Figura 3). El trímero posee un dominio extracelular muy extenso que sobresale

aproximadamente 70 Å sobre el plano de la membrana, y una región transmembrana de 28 Å (Figura 3). El canal está formado por seis hélices TM, dos por cada subunidad que lo compone. Los segmentos TM1 forman múltiples interacciones con las hélices TM2 de la misma subunidad, pero también con los TM1 y TM2 de las otras subunidades. Así, las hélices TM1 presentan la mayoría de los contactos con la bicapa lipídica, mientras que las TM2 recubren el poro iónico. (Gonzales *et al.*, 2009) La entrada y salida del canal están formadas principalmente por residuos hidrofóbicos e incluyen aproximadamente dos vueltas de las hélices  $\alpha$  de los TM2 (Kawate *et al.*, 2009). En la región extracelular, las láminas  $\beta$  centrales interaccionan con las subunidades adyacentes, mientras que no se producen contactos entre ellas en la base de dicha región. Esta conformación podría permitir a las hélices TM el movimiento hacia una conformación abierta tras la interacción de la región extracelular con el ligando. (Kawate *et al.*, 2009)

En este sentido, Gouaux y su grupo proponen que el sitio de unión del ATP a los receptores P2X se localiza en las ranuras que quedan entre las distintas subunidades (Kawate *et al.*, 2009). Estas ranuras están formadas por residuos conservados que se han descrito implicados en la apertura del canal, dependiente de ATP (Jiang *et al.*, 2000a; Ennion y Evans, 2002; Roberts y Evans, 2004, 2006; Marquez-Klaka *et al.*, 2007).

Los receptores homoméricos están compuestos por subunidades idénticas, aunque en el caso de las subunidades P2X5 y P2X6, esta interacción presenta mayor dificultad (King *et al.*, 2000; Wildman *et al.*, 2002; Barrera *et al.*, 2005). Además de estos homo-oligómeros, las distintas subunidades P2X pueden interaccionar entre sí formando hetero-oligómeros (Torres *et al.*, 1999), aunque este ensamblaje no se produce aleatoriamente entre cualquier subunidad P2X. Hasta la fecha se han descrito varios receptores heteroméricos: P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6 y P2X4/P2X6 (Roberts *et al.*, 2006; Abbracchio *et al.*, 2009). La heteromerización de la subunidad P2X7 aun no está claramente establecida ni descartada. Durante mucho tiempo se pensó que únicamente formaba homo-oligómeros, sin embargo, en el año 2007 se propuso su intervención en heterómeros funcionales con la subunidad P2X4 (Guo *et al.*,

2007). Por el contrario, estudios posteriores indican que estos trímeros no son estables o no representan un porcentaje significativo en los modelos estudiados (Nicke, 2008).



**Figura 3. Modelo estructural de los receptores P2X triméricos.** Cada subunidad se representa en un color diferente. A. Vista en paralelo a la membrana. B. Vista perpendicular a la membrana desde el espacio extracelular. Adaptado de Kawate *et al.*, 2009.

Los receptores P2X no aparecen insertados de forma aleatoria en la membrana celular, sino que, por el contrario, pueden aparecer agrupados o localizados en diferentes partes de la célula. A modo de ejemplo, se registraron respuestas mediadas por el receptor P2X2 en las terminales pre-sinápticas de las interneuronas hipocámpales, pero, sin embargo, no se observaron respuestas de este tipo en el soma neuronal (Khakh *et al.*, 2003). Dado que la membrana celular

no es homogénea, los receptores pueden agruparse junto a las proteínas de membrana en microdominios. Un posible mecanismo para mantener las proteínas y moléculas de señalización juntas, puede ser su inclusión en balsas lipídicas ("lipid rafts"), como sucede para los receptores P2X1, P2X3 y P2X7 (Vacca *et al.*, 2004; Vial y Evans, 2005; Gonnord *et al.*, 2009). Sin embargo, otros receptores, como los P2X2 y P2X4, no parecen estar asociados a lipid rafts en neuronas granulares del cerebelo (Vacca *et al.*, 2004).

### **Características funcionales y regulación de los receptores P2X.**

Las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores P2X dependen de las subunidades que componen el canal. Los diferentes receptores P2X pueden ser clasificados en función de su perfil de respuesta, su afinidad por agonistas y antagonistas y su sensibilidad ante la regulación por calcio, magnesio, protones o zinc. En los receptores heteroméricos las características pueden venir determinadas por una de las subunidades que lo forman, o ser una combinación de las características de las distintas subunidades integrantes del receptor. Sin embargo, es muy usual que en el mismo tejido o tipo celular se coexpresen diversas subunidades complicando el estudio de las mismas.

La activación de los receptores P2X produce la entrada rápida (en el orden de milisegundos) y no selectiva de cationes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  o  $\text{K}^{+}$  (Bo *et al.*, 2003). La permeabilidad relativa para cada uno de estos iones varía en función de la subunidad P2X implicada, aunque también puede modificarse dependiendo de su regulación. Los receptores P2X1 y P2X3 son los que más rápido pierden la respuesta en presencia continuada del agonista (desensibilización), decayendo dicha respuesta en un 90% tras 1-2 segundos de aplicación del agonista. Las respuestas de los otros receptores P2X son mucho más sostenidas, situándose en el extremo contrario el receptor P2X7, cuya respuesta se mantiene durante minutos en presencia del agonista (North, 2002). En algunos casos la desensibilización sucede como consecuencia de un cambio conformacional a una forma cerrada del receptor unido al agonista, requiriéndose varios minutos de lavado para recobrar la funcionalidad completa (Rettinger y Schmalzing, 2003). Esta recuperación puede regularse por muchos factores, incluyendo el agonista



empleado (Sokolova *et al.*, 2004) o la concentración extracelular de calcio (Wildman *et al.*, 2002).

Los estudios de la apertura y cierre del canal y la conductividad de iones en estos receptores indican que la regulación de estos dos componentes está mediada por la interacción de varias regiones del canal. Es muy posible que se produzcan cambios conformacionales en el dominio extracelular de los receptores P2X, semejantes a los vistos en otros receptores ante la unión de su ligando (Jin *et al.*, 2003). Estos cambios coordinarían la unión de alta afinidad de los grupos adenina y trifosfato del ATP a estos receptores, lo que explicaría la selectividad de los receptores P2X por determinados ligandos. En la región extracelular de varios receptores P2X, existen residuos conservados de prolina y glicina que podrían dotar de flexibilidad y estar implicados en los cambios conformacionales ante la unión del agonista (Nakazawa y Ohno, 1999; Nakazawa *et al.*, 2004). Por otro lado, varios estudios con receptores P2X quiméricos demuestran cómo la interacción entre los dos segmentos transmembrana de los receptores modula la apertura y cierre de los canales (Werner *et al.*, 1996; Haines *et al.*, 2001).

El dominio intracelular también colabora en la regulación de la apertura del canal y la permeabilidad iónica. Las fosforilaciones en serina, treonina o tirosina en determinadas zonas de este dominio regulan de forma importante la actividad de los receptores. (Boue-Grabot *et al.*, 2000; Toth-Zsomboki *et al.*, 2002). Por ejemplo, en la zona de transición entre el dominio TM2 y el C-terminal del receptor P2X7 se localiza una tirosina (Tyr343), cuya desfosforilación tras la activación del canal reduce la duración de la respuesta (Becker *et al.*, 2008). En ciertas isoformas, las mutaciones que eliminan la secuencia de unión a PKC, presente en la zona N-terminal del receptor y que se encuentra constitutivamente fosforilada, pueden aumentar la velocidad de desensibilización. Esto pone de manifiesto que el extremo N-terminal participa directamente en la regulación de la conductividad iónica a través de estos canales (Boue-Grabot *et al.*, 2000; Ennion y Evans, 2002; Liu *et al.*, 2003). En cuanto al extremo C-terminal, conserva en todas las isoformas un motivo YxxxxK, cercano al TM2, que está asociado al correcto transporte del receptor a la membrana y a la estabilización de su expresión en la superficie

celular (Bobanovic *et al.*, 2002; Chaumont *et al.*, 2004). Además, estudios de mutagénesis dirigida sugieren también que puede estar relacionado con la regulación de la apertura en sí y de las propiedades del poro de estos receptores (Eickhorst *et al.*, 2002).

Los receptores P2X están modulados alostéricamente por protones extracelulares, cationes divalentes y varios metales, como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  (North, 2002). Kawate y cols. han propuesto la presencia de 4 sitios de unión de cationes di- y trivalentes en el receptor P2X<sub>4</sub>, uno en el centro de la región extracelular, los otros 3 en la periferia del receptor (un sitio por cada subunidad), y han mostrado una regulación negativa del receptor por parte de estos iones (Kawate *et al.*, 2009).

La actividad de otros receptores puede modular igualmente la respuesta de los canales P2X, como es el caso de determinados receptores acoplados a proteínas G. Entre ellos se encuentran los receptores de serotonina, el receptor de glutamato mGluR1 $\alpha$ , o los receptores purinérgicos P2Y (Nakazawa *et al.*, 1994; Vial *et al.*, 2004a). En este sentido, se ha descrito que la activación de receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub> en terminaciones nerviosas de cerebro medio de rata, es capaz de potenciar las respuestas generadas por los receptores P2X presinápticos (Gomez-Villafuertes *et al.*, 2003). Asimismo, los receptores P2X pueden también interaccionar con otros canales iónicos. En terminales nerviosas colinérgicas, los receptores nicotínicos modulan la actividad de los P2X mediante la activación de la proteína CaMKII (Diaz-Hernandez *et al.*, 2004a; Diaz-Hernandez *et al.*, 2006).

La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de calcio libre, que despolariza la membrana. Esto induce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de calcio a través del propio canal P2X. El incremento del calcio citosólico dispara posteriormente una serie de eventos intracelulares como activación o inhibición de proteínas quinasas, entre las que se encuentran la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) (Diaz-Hernandez *et al.*, 2004a; Diaz-Hernandez *et al.*, 2006; Leon *et al.*, 2006), MAP quinasas (MAPK), proteína quinasa C (PKC) (Erb *et al.*, 2006) o glucógeno sintasa

quinasa 3 (GSK-3) (Diaz-Hernandez *et al.*, 2008; Gomez-Villafuertes *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2009); así como la liberación vesicular de neurotransmisores como acetilcolina (Diaz-Hernandez *et al.*, 2002a), glutamato (Gualix *et al.*, 2003) o GABA (Gomez-Villafuertes *et al.*, 2001).

### **Características farmacológicas.**

Las herramientas farmacológicas disponibles a la hora de discriminar entre los diferentes receptores P2X son en muchos casos limitadas, e incluso existen agonistas y antagonistas que, a las mismas concentraciones, pueden actuar tanto sobre receptores P2X como P2Y.

En general pueden distinguirse dos grandes grupos en la familia de los receptores P2X: Los receptores P2X1 y P2X3 se caracterizan ambos por presentar una elevada afinidad por el ATP. Además, son activados por el análogo estructural del ATP  $\alpha,\beta$ -meATP, sufren una desensibilización rápida, inactivándose totalmente tras 1-2 segundos de exposición al ATP y muestran una recuperación lenta a la desensibilización. El resto de receptores, P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7, muestran menor afinidad por el ATP, insensibilidad al  $\alpha,\beta$ -meATP (excepto el P2X6) y desensibilización menos marcada (North, 2002; Gever *et al.*, 2006). Las curvas de dosis-respuesta para los receptores P2X expresados en sistemas heterólogos muestran que la  $EC_{50}$  para el ATP varía desde concentraciones submicromolares ( $EC_{50} \sim 0,1 \mu M$ , P2X1, 3), hasta el micromolar bajo ( $EC_{50} = 10 \mu M$ , P2X2, 4, 6). De todos los receptores homoméricos P2X, el constituido por las subunidades P2X7 es el que presenta menor afinidad para el ATP, con una  $EC_{50}$  elevada ( $400 \mu M$ ) (North, 2002; Gever *et al.*, 2006). En la Tabla 4 se resumen las características farmacológicas de estos receptores.

**Tabla 4.- Clasificación de los receptores P2X homoméricos.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Norenberg y Illes, 2000; Khakh *et al.*, 2001; North, 2002; King y Townsend-Nicholson, 2003; Illes y Alexandre Ribeiro, 2004; Burnstock, 2007b; Chambers *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010

Receptor	EC <sub>50</sub> (ATP)	Potencia de agonistas (EC <sub>50</sub> )	Antagonistas (IC <sub>50</sub> )	Modulación por iones	Desensibilización	Distribución mayoritaria
P2X1	0,1 μM	ATP=2MeSATP≥Ap <sub>6</sub> A≥α,β-meATP>BzATP>ADP	NF449>TNP-ATP>Ip <sub>5</sub> I>MRS2257>PPADS (rango nM) Suramina>RB 2 (rango μM)	H <sup>+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos
P2X2	5 μM	ATP ≥ATP <sub>γ</sub> S≥2MeSATP>Ap <sub>4</sub> A α,β-meATP y ADP inactivos	RB 2=NF279, NF770>PPADS= TNP-ATP=BBG≥Suramina (rango μM)	H <sup>+</sup> ↑ Zn <sup>2+</sup> ↑ Cu <sup>2+</sup> ↑ Ca <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, células cromafines, músculo liso, retina
P2X3	1,3 μM	2MeSATP≥ATP=α,β-meATP>Ap <sub>5</sub> A>ADP	TNP-ATP>MRS2257=A317491>MRS2159=PPADS (rango nM) NF279=NF449>Ip <sub>5</sub> I≥Suramina>NF023>RB 2 (rango μM) A317491, NF110, rojo fenol	Zn <sup>2+</sup> ↑ H <sup>+</sup> ↓ Ca <sup>2+</sup> ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales
P2X4	4 μM	ATP>2MeSATP α,β-meATP y ADP inactivos Potenciación por Ivermectina, Propofol y Cibacron blue	TNP-ATP>BBG (rango μM) fenoltaleína	H <sup>+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↑ Cd <sup>2+</sup> ↑	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon
P2X5	0,4 μM	ATP=2MeSATP=Ap <sub>4</sub> A>α,β-meATP y ADP inactivos	PPADS>TNP-ATP>Suramina>RB 2 (rango μM)	Zn <sup>2+</sup> ↑ H <sup>+</sup> ↓ Ca <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Ganglio del trigémino, médula espinal, células proliferativas de la piel, timo, vejiga
P2X6	0,6 μM	2MeSATP>ATP=α,β-meATP ADP inactivo	TNP-ATP> PPADS Insensible a Suramina	---	Lenta	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal
P2X7	400 μM	BzATP>>ATP 2MeSATP, ATP <sub>γ</sub> S y ADP inactivos	A-740003 ≥ A-438079 (rata, humano) BBG (rango nM) (rata) PPADS=TNP-ATP (rango nM) KN-62 (rango nM) (humano) Derivados de pirazolacetamida (rango nM) y de benzamida (rango nM)	H <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Ganglios de retina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel.

#### 1.4.2.2.1 Receptor P2X7

El receptor P2X7, inicialmente denominado P2Z, se distingue del resto de receptores P2X por su largo extremo C terminal y su baja sensibilidad por el ATP (North, 2002).

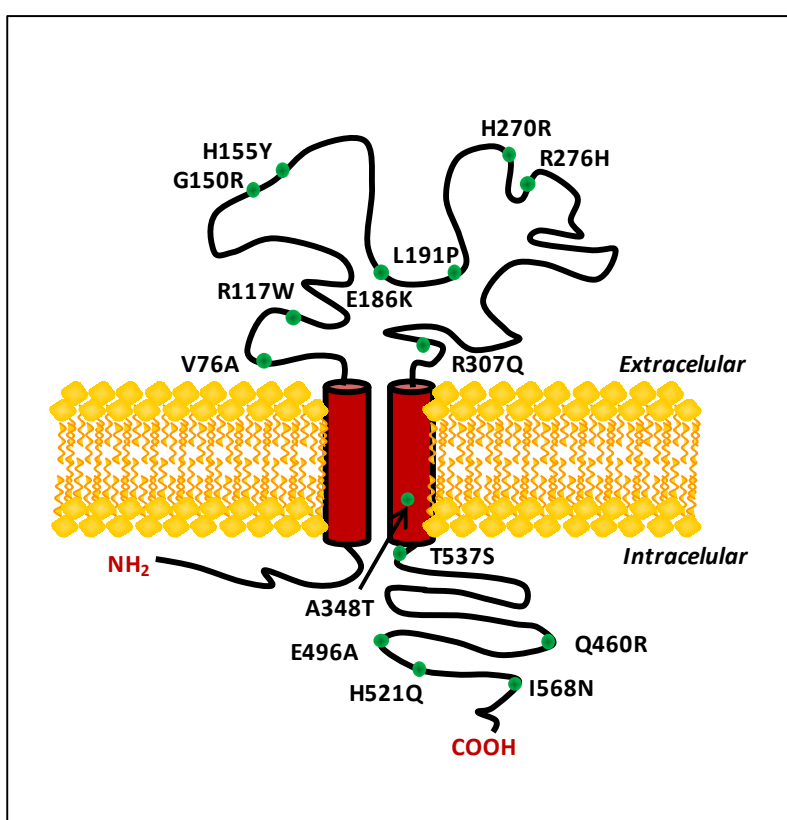
El gen del receptor P2X7 humano se localiza en el cromosoma 12 (12q24). Inicialmente se describió conteniendo 13 exones que codificaban para una proteína de 595 aminoácidos (Buell *et al.*, 1998), sin embargo, hoy en día se conoce la existencia de dos nuevos exones: el exón 1' en rata, localizado en la región intrónica entre el exón 1 y el exón 2 (Nicke *et al.*, 2009), y en humano el exón N3, localizado en la región intrónica entre el exón 2 y el 3 (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005).

Hasta la fecha se han descrito 10 variantes de splicing (P2X7b-P2X7k), 9 en humano (P2X7b-P2X7j) y una en rata y ratón (P2X7k), aunque sólo 4 de estas variantes se han detectado a nivel proteico (P2X7b, P2X7h, P2X7j y P2X7k) (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006; Nicke *et al.*, 2009), y sólo dos de ellas parecen ser funcionales (P2X7b y P2X7k) (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005; Nicke *et al.*, 2009). La variante P2X7a es la proteína completa.

Además, se han identificado multitud de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen del receptor P2X7 humano. (Figura 4) La mayoría de estos SNPs confieren la pérdida de función de algunos eventos activados por el receptor P2X7 (Gu *et al.*, 2001; Wiley *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2004; Shemon *et al.*, 2006; Roger *et al.*, 2010), aunque algunos también inducen ganancia de función (Cabrini *et al.*, 2005; Denlinger *et al.*, 2006; Roger *et al.*, 2010; Stokes *et al.*, 2010).

El extremo C-terminal del receptor P2X7 posee una longitud extrema, que alcanza los 240 aminoácidos y posee numerosas secuencias de interacción con otras proteínas. Entre ellas destacan: la tirosina-fosfatasa  $\beta$  (RPTP $\beta$ ), la  $\alpha$ -actinina 4, la  $\beta$ -actina, la supervillina, 3 proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsc71), la fosfatidilinositol 4 quinasa (PI4K), la guanilato quinasa P55 asociada a membrana (MAGuK), las miosinas IIA y Va, GRK-3, dinamina, clatrina, caveolina 1 y calmodulina (Kim *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2007; Roger *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009). También se encuentran en el extremo C-terminal de

este receptor dominios SH2 (Surprenant *et al.*, 1996) y una secuencia de unión a lípidos similar a la secuencia de unión a lipopolisacárido encontrada en otras proteínas, que parece estar involucrada en el transporte a membrana y en la funcionalidad del receptor (Denlinger *et al.*, 2003). Además, Becker y cols. han propuesto que la interacción física observada entre el receptor y el dominio C-terminal conecta señales del exterior e interior de la célula controlando así la apertura y cierre del canal (Becker *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Localización de algunos polimorfismos de un solo nucleótido no silenciosos en el receptor P2X7. Datos obtenidos de Stokes *et al.*, 2010 y Roger *et al.* 2010.

### Características farmacológicas.

Como se ha mencionado anteriormente, los receptores P2X7 homoméricos son activados por elevadas concentraciones de ATP ( $EC_{50}$  400  $\mu$ M). El receptor P2X7 también puede ser estimulado por BzATP, siendo éste un agonista significativamente más potente ( $EC_{50}$  20  $\mu$ M) que el ATP (Young *et al.*, 2007). Sin embargo el BzATP no es un agonista selectivo del receptor P2X7, puesto que

también activa los receptores P2X1 y P2X3 (Bianchi *et al.*, 1999), el receptor metabotrópico P2Y<sub>2</sub> (Erb *et al.*, 1993; Wildman *et al.*, 2003) y el receptor metabotrópico P2Y<sub>13</sub> en astrocitos de cerebelo de rata (Carrasquero *et al.*, 2009).

Otra característica de este receptor es la potenciación de sus respuestas ante una reducción de la concentración de cationes divalentes, como el calcio o el magnesio, en el medio extracelular (Surprenant *et al.*, 1996). Otros cationes divalentes como el zinc y el cobre también inhiben la respuesta en estos receptores (Virginio *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2008). Estas observaciones indican que, bien es la forma ATP<sup>4-</sup> el ligando activo de esta subunidad (los cationes divalentes se unirían al ATP<sup>4-</sup> reduciendo la concentración efectiva del ligando), o bien los cationes divalentes son capaces de inhibir alostéricamente al receptor P2X7.

El receptor P2X7 humano, de ratón y de rata, puede ser antagonizado, con moderada potencia ( $pIC_{50} = 4,2-6,0$ ), por el PPADS, un inhibidor no selectivo de los receptores P2X. La suramina, otro inhibidor no selectivo de receptores P2X (y P2Y) ha mostrado ser un antagonista débil, o incluso inactivo, del receptor P2X7 (Gever *et al.*, 2006). El Brilliant Blue G (BBG) es un antagonista más potente y selectivo de los receptores P2X7, sobre todo en rata ( $IC_{50} \sim 10-15$  nM) y en ratón ( $IC_{50}$  100 nM), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ( $IC_{50} \geq 10\mu M$ ) (Jiang *et al.*, 2000b; Young *et al.*, 2007). El BBG se une al receptor por un sitio de unión diferente al del ATP y posee una ratio lenta de disociación (Michel *et al.*, 2007). El ATP oxidado (oATP) es un inhibidor irreversible de los receptores P2X7 que requiere incubaciones de 1 a 2 horas para inhibir la activación de los canales (Di Virgilio, 2003), sin embargo posee otras acciones farmacológicas como bloqueo de los receptores P2X1 y P2X2 (Evans *et al.*, 1995) o reducción de la señalización proinflamatoria (Beigi *et al.*, 2003).

Otros bloqueantes, como el KN-62 (descrito inicialmente como inhibidor de la calcio/calmodulina quinasa tipo II, CaMKII), ejercen su efecto en función de la especie, bloqueando el receptor P2X7 humano de forma no competitiva, pero no así el de rata (Gargett y Wiley, 1997; Humphreys *et al.*, 1998). En 2006 los laboratorios Abbot generaron dos nuevos antagonistas selectivos para esta subunidad, el A-438079, tetrazol que bloquea de forma competitiva y reversible

los receptores P2X7, y el A-740003, cianoguanidina que actúa de forma competitiva sobre estos receptores, ambos con acción tanto en rata como en humano, en el rango nanomolar alto (Honore *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2006). Recientemente se han desarrollado dos nuevos antagonistas de los receptores P2X7 humanos y de rata, uno derivado de pirazolacetamida (Chambers *et al.*, 2010) y el otro derivado de cicloheptanol clorobenzamida, ambos con una IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar (Chen *et al.*, 2010).

El P2X7 es el receptor que menos se desensibiliza y sus corrientes se mantienen en presencia de ATP y BzATP durante aplicaciones prolongadas (hasta minutos) (North, 2002). Además, las aplicaciones de larga duración a veces van acompañadas de incrementos en la amplitud de la corriente (Surprenant *et al.*, 1996; Virginio *et al.*, 1997; North, 2002).

#### **Señalización del receptor P2X7.**

La estimulación del receptor con agonistas durante un breve periodo de tiempo (<10 segundos) conduce a una apertura rápida y reversible del canal, que permite el paso de iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Surprenant *et al.*, 1996). Los cambios producidos en la concentración intracelular de potasio, como consecuencia de dicha activación, inducen la activación de caspasa-1 y la liberación de IL-1β en células del sistema inmune y microglía (Kahlenberg y Dubyak, 2004; Ferrari *et al.*, 2006).

La activación de los receptores P2X7 y la consecuente entrada de calcio a la célula también se ha asociado con otras vías de señalización entre las que se incluyen la fosfolipasa D (Humphreys y Dubyak, 1996), Nf-κB (Ferrari *et al.*, 1997a), GSK-3 (Diaz-Hernandez *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2010) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Aga *et al.*, 2002). Diversos estudios demuestran que las diferentes MAPKs afectadas por la activación del receptor P2X7 varían dependiendo del modelo de estudio. Por ejemplo, en células del astrocitoma humano 1321, la activación del receptor P2X7 recombinante media el incremento en la activación de ERK1/2 (Gendron *et al.*, 2003), mientras que no ocurre así en células humanas diferenciadas THP-1 (Donnelly-Roberts *et al.*, 2004).



Además, el calcio citoplásmico es importante para la liberación de neurotransmisores, en un proceso dependiente de calmodulina. En esta cascada de señalización, el calcio activa la calmodulina, que activa a su vez la calmodulina quinasa II (CaMKII). Esta quinasa fosforila la sinapsina de la superficie de las vesículas sinápticas, provocando la liberación de las vesículas del citoesqueleto, de modo que puedan fusionarse con las zonas activas de la terminal presináptica y liberar así su contenido de neurotransmisores (Lin *et al.*, 1990; Leon *et al.*, 2006).

Por otro lado, la activación del receptor P2X7 también es capaz de inducir la activación de otras proteínas en un proceso independiente de la entrada de calcio, como por ejemplo la activación de PKD en astrocitos de rata en cultivo (Carrasquero *et al.*, 2010).

En último lugar cabe destacar que la estimulación del receptor P2X7 induce su propia redistribución en la membrana y el citosol. Este proceso se asocia con cambios en el estado de fosforilación del receptor y con un aumento en la interacción del receptor a GRK-3 (receptor quinasa acoplado a proteína G),  $\beta$ -arrestina-2 y dinamina (Feng *et al.*, 2005).

### **El receptor P2X7 en el Sistema Nervioso y su función neuronal. Implicaciones en neuroprotección y neurodegeneración.**

El receptor P2X7 se expresa en una gran variedad de tejidos y se asocia a múltiples funciones. Inicialmente se clonó en macrófagos (Buisman *et al.*, 1988; Di Virgilio, 1995) y se describió su expresión, junto con los receptores P2X1 y P2X4, en una gran variedad de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos B y T, monocitos, eritrocitos, macrófagos y microglía (Burnstock y Knight, 2004). Así, este receptor participa en el proceso inflamatorio por medio de la liberación de IL-1 $\beta$  en macrófagos y microglía activada, lo que puede causar la apoptosis en las células circundantes (Ferrari *et al.*, 2006; Di Virgilio, 2007).

Durante mucho tiempo se postuló que el receptor P2X7 estaba ausente de las neuronas, siendo expresado únicamente por células no neurales del sistema nervioso como microglía, linfocitos, macrófagos y astrogliá (Collo *et al.*, 1997). Estudios recientes utilizando técnicas de hibridación *in situ* y análisis por RT-PCR han permitido detectar la presencia del ARNm del receptor P2X7 en diversas

áreas del SNC como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la médula espinal, el cerebelo, el estriado, el tálamo e hipotálamo y el hipocampo (Yu *et al.*, 2008b). Además, cada vez son más los trabajos que ponen de manifiesto la expresión funcional de estos receptores en neuronas (Hervas *et al.*, 2003; Miras-Portugal *et al.*, 2003; Hervas *et al.*, 2005; Sanchez-Nogueiro *et al.*, 2005; Leon *et al.*, 2006; Alloisio *et al.*, 2008; Diaz-Hernandez *et al.*, 2008; Marin-Garcia *et al.*, 2008; Sanchez-Nogueiro *et al.*, 2009), participando en numerosas e importantes funciones.

Cabe destacar la significativa presencia del receptor P2X7 en las terminales nerviosas, dado que más del 50% presentan marcaje con anticuerpos frente a dicha subunidad, y es posible, además, medir respuestas presinápticas en ellas al estimularlas con agonistas específicos del receptor P2X7 (Miras-Portugal *et al.*, 2003; Hervas *et al.*, 2005). Esta localización tan específica apoya una de las funciones más importantes de estos receptores, la modulación de la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el GABA (Atkinson *et al.*, 2004; Papp *et al.*, 2007; Sperlagh *et al.*, 2007; Leon *et al.*, 2008).

Los receptores P2X7 se han descrito como agentes involucrados en procesos neurodegenerativos regulando la concentración intracelular de calcio, la liberación y procesamiento de la IL-1 $\beta$ , activación de caspasas y liberación de glutamato en condiciones patológicas como inflamación, daño mecánico, isquemia y estrés (Solle *et al.*, 2001; Le Feuvre *et al.*, 2002; Chessell *et al.*, 2005; Sperlagh *et al.*, 2006). En pacientes afectados de Alzheimer, así como en modelos de ratones transgénicos empleados en el estudio de esta enfermedad, la expresión del receptor P2X7 en cerebro se encuentra incrementada alrededor de las placas amiloides y localizada en la microglía activada y en astrocitos (Parvathenani *et al.*, 2003; McLarnon *et al.*, 2006). Los receptores P2X7, además, median la producción de peróxido de hidrógeno en microglía, contribuyendo así a la neurodegeneración que sucede en un modelo animal de esta enfermedad (Parvathenani *et al.*, 2003; McLarnon *et al.*, 2006). Una descripción más detallada del papel de este receptor en la enfermedad de Alzheimer se dará en la sección 4.

En otros sistemas, como las neuronas granulares de cerebelo de rata, la activación de este receptor está asociada a la supervivencia neuronal frente a determinados estímulos proapoptóticos (Ortega *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2010). Los receptores P2X7 también median la producción de 2-araquidonilglicerol y endocannabinoides en astrocitos y microglía, contribuyendo en los procesos neuroprotectores (Witting *et al.*, 2004; Witting *et al.*, 2006). Además, la estimulación de los receptores induce la fosforilación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc) lo que genera un efecto inhibitorio de la inflamación en la microglía (Potucek *et al.*, 2006).

## **2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

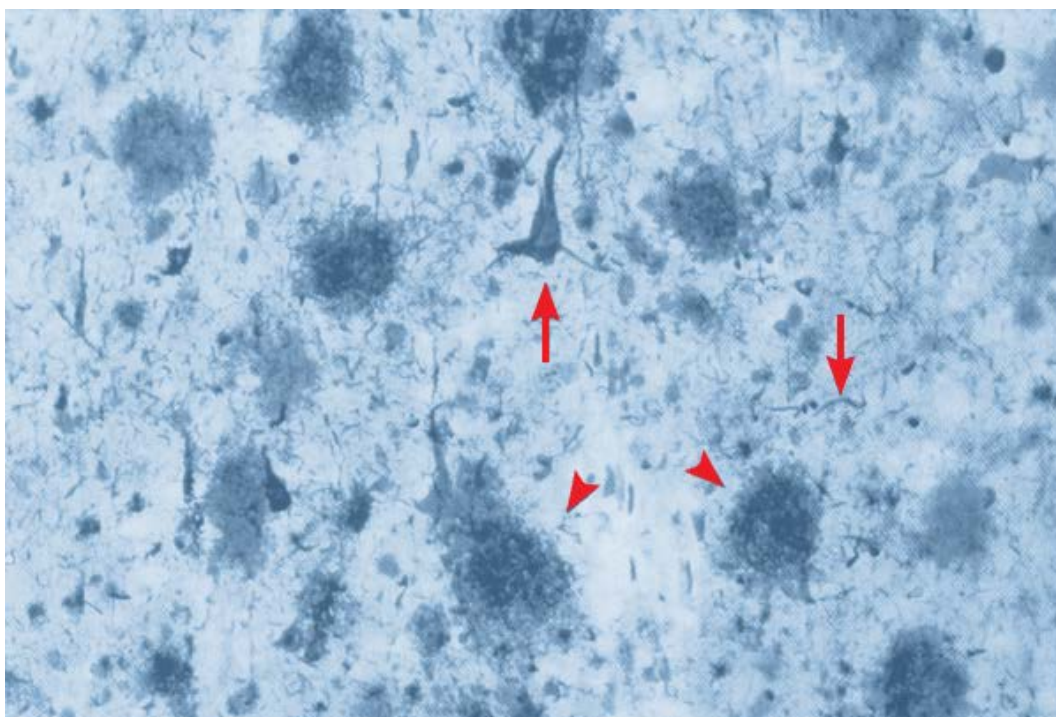
La enfermedad de Alzheimer fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer, psiquiatra y neurólogo alemán que fue pionero en asociar síntomas clínicos con cambios microscópicos en el cerebro. Publicó en 1906 el caso de Auguste Deter, una paciente que estudió desde 1901 y que sufría pérdida profunda de memoria, se sentía perseguida, veía objetos ocultos y otros cambios psicológicos que empeoraban con el tiempo. Tras el fallecimiento de la paciente, en la autopsia cerebral observó cambios dramáticos y depósitos anormales dentro y alrededor de las neuronas.

### **2.1 Sintomatología de la Enfermedad de Alzheimer.**

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia, afectando al 10% de la población mayor de 65 años y al 50% de la población mayor de 85. Además, existe un pequeño sub-grupo de pacientes con un desarrollo temprano de la enfermedad (entre la cuarta y la sexta década) debido a la presencia de mutaciones de herencia dominante. La mayoría de estos casos familiares (Enfermedad de Alzheimer Familiar o FAD) presentan mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora de amiloide (APP) y las presenilinas (PS1 y PS2). Se han realizado esfuerzos importantes para entender los mecanismos que subyacen a estos genes asociados a FAD ya que

sus rasgos clinicopatológicos son idénticos a aquellos que presenta la enfermedad de desarrollo normal.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una demencia progresiva, una pérdida gradual de la memoria de acontecimientos recientes y de la capacidad de razonar y de manipular objetos cotidianos. La progresión de la enfermedad lleva a una pérdida completa de la capacidad cognitiva con total apatía emotiva y desconexión del entorno. Desde el punto de vista de la fisiopatología, la enfermedad se caracteriza por una atrofia notable de la corteza cerebral, con aparición de placas neuríticas extracelulares (o placas seniles), que son depósitos de péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) de diferente tamaño. Estos péptidos son producidos por el fraccionamiento proteolítico secuencial de la proteína precursora de amiloide APP. En el interior de las neuronas aparecen otros acúmulos conocidos con el nombre de ovillos neurofibrilares (NFTs), constituidos en su mayoría por una forma hiperfosforilada de la proteína tau (Figura 5).



**Figura 5. Neuropatología principal de la enfermedad de Alzheimer, visualizada al microscopio en corteza cerebral de un paciente.** Se aprecian las placas de amiloide (puntas de flecha) y los ovillos neurofibrilares (flechas)

## 2.2 Proteína tau.

La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). El gen de la proteína tau se localiza en humanos en el cromosoma 17. Su expresión se encuentra regulada por mecanismos de splicing alternativo y existen seis isoformas diferentes en el cerebro adulto humano.

Se expresa principalmente en neuronas, donde juega un papel importante en el ensamblaje de los monómeros de tubulina en microtúbulos para formar la red de microtúbulos neuronal, los cuales contribuyen al mantenimiento de la forma celular y sirven como vía de transporte a través de los axones. Tau también establece vínculos entre microtúbulos y otros elementos del citoesqueleto, como los neurofilamentos y los filamentos de actina, u otras proteínas, como la espectrina (Buée *et al.*, 2000). Estudios anteriores demostraron que estas actividades están reguladas en gran parte por el estado de fosforilación de tau (Mandelkow *et al.*, 1995; Lovestone *et al.*, 1997), así como por el número de dominios funcionales de unión a tubulina, localizados en el extremo C-terminal. Esto último depende del corte alternativo del exon 10 (Goedert *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1991).

La proteína tau, en su forma hiperfosforilada, es el constituyente mayoritario de los ovillos neurofibrilares (NFTs) descritos en la enfermedad de Alzheimer y numerosos trastornos neurodegenerativos denominados “taupatías”. La fosforilación anormal de la proteína hace perder la capacidad de tau de unirse a los microtúbulos y lograr su ensamblaje. La hiperfosforilación de tau causa degeneración neurofibrilar, secuestrando proteínas asociadas a los microtúbulos (Andorfer *et al.*, 2003). El desplazamiento y sustitución en el citoesqueleto normal por NFTs de tau hiperfosforilada, hace que se depositen acúmulos de  $\beta$ -amiloide en el espacio extracelular, el parénquima cerebral y sus vasos. La tau hiperfosforilada, a diferencia de la normal, no estimula el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos y provoca su desensamblaje mediante el secuestro de MAPs (Cleveland, 1977). La rotura de la red microtubular compromete el flujo axoplásmico y produce degeneración retrógrada (Oddo, 2004).

### **2.3 Proteína precursora de amiloide (APP).**

El gen *APP* se localiza en humanos en el cromosoma 21. El procesamiento alternativo del producto de dicho gen conduce a la generación de múltiples isoformas de la proteína APP, siendo las tres principales APP695, APP751 y APP770 (de 695, 751 y 770 aminoácidos, respectivamente). APP751 y APP770 se expresan en la mayoría de los tejidos y contienen un dominio Inhibidor de Proteasa Kunitz (KPI), de 56 aminoácidos, dentro de sus regiones extracelulares (Zhang *et al.*, 2011). APP695 se expresa predominantemente en neuronas y carece de este dominio KPI (Kang *et al.*, 1990; Rohan de Silva *et al.*, 1997). Existen estudios que demuestran que los niveles de proteína y de ARNm de las isoformas APP751 y APP770 se encuentran elevados en cerebros de pacientes con Alzheimer y se asocian a un aumento en los depósitos de A $\beta$  (Menendez-Gonzalez *et al.* 2005). También se ha visto que una activación prolongada de receptores extracelulares de NMDA en neuronas puede conllevar una mayor expresión de las isoformas que contienen el dominio KPI, acompañada de un aumento en la producción del péptido A $\beta$  (Bordji *et al.*, 2010).

APP pertenece a una familia de proteínas que, en mamíferos, incluye a la APP-like protein 1 (APLP1) y la APP-like protein 2 (APLP2) (Wasco *et al.*, 1992; Wasco *et al.*, 1993). Todas ellas son proteínas transmembrana tipo I y se procesan de manera similar. El dominio A $\beta$  se encuentra únicamente en la proteína APP, aunque la familia comparte otros dominios conservados, como los dominios E1 y E2 en la secuencia extracelular. Estudios realizados con ratones knockout (KO) sugieren alguna redundancia funcional entre estos homólogos, ejercida por motivos diferentes al dominio A $\beta$ . Los ratones KO para APP son viables y fértiles, aunque presentan un fenotipo ligeramente anormal (Zheng *et al.* 1995; Dawson *et al.*, 1999). Los ratones KO para APLP1 y APLP2 también son viables y fértiles, pero los ratones doble knockout APP/APLP2 y APLP1/APLP2 y los ratones triple knockout APP/APLP1/APLP2 muestran una elevada tasa de letalidad post-natal (von Koch *et al.*, 1997; Heber *et al.*, 2000; Herms *et al.*, 2004). Curiosamente los ratones doble knockout APP/APLP1 son viables, lo que sugiere que APLP2 es crucial cuando APP o APLP1 están ausentes.

### 2.3.1 Función de la APP

A pesar de haber sido objeto de muchos estudios desde su descubrimiento, las funciones fisiológicas de la APP siguen sin estar claramente identificadas. Sin embargo, los trabajos de varios grupos sugieren que esta proteína juega un papel importante en procesos fundamentales para el desarrollo neuronal:

#### Movimiento celular y crecimiento neurítico

La migración celular y el crecimiento de neuritas se encuentran influenciadas por la interacción entre la membrana celular, la matriz extracelular y señales solubles que conducen a la reorganización del citoesqueleto de actina (Soldano *et al.*, 2014). Está demostrado que la APP interacciona con varios componentes de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I (Behr *et al.*, 1996), la laminina (Kibbey *et al.*, 1993) o los proteoglicanos de heparán sulfato (Caceres *et al.*, 1997). Varios estudios se centran en los mecanismos moleculares de estas interacciones y su efecto en el movimiento celular. Uno de ellos demuestra que la tasa de migración celular *in vitro* aumenta con la sobreexpresión de APP, posiblemente debido a su interacción con la proteína de unión a actina Mena y la modulación de la polimerización de la actina. Estas observaciones fueron confirmadas *in vivo* al demostrar que la APP se localiza en el cono de crecimiento (Sabo *et al.*, 2003) sugiriendo un papel de la APP en la regulación de la motilidad del cono de crecimiento. Más recientemente otros grupos han analizado en detalle el papel de la APP en la formación y extensión del cono de crecimiento y observaron que el sAPP $\alpha$  (fragmento soluble de la APP, generado tras su procesamiento por la  $\alpha$ -secretasa) interacciona con la semaforina 3A (Sema3A), un inhibidor del crecimiento axonal. sAPP $\alpha$  inhibe el colapso del cono de crecimiento inducido por Sema3A sugiriendo que el papel de la APP en el movimiento celular y crecimiento axonal está mediado por modificaciones en el citoesqueleto. La APP también media la adhesión a la laminina extracelular (Sosa *et al.*, 2013). La pérdida de APP en cultivos de hipocampo reduce la adhesión de la laminina, el tamaño del cono de crecimiento y la longitud axonal. La actividad neuronal y la consiguiente movilización de calcio intracelular también son

importantes reguladores del crecimiento neurítico al activar fosfatasa del citoesqueleto (Robles *et al.*, 2003). La neutralización de sAPP $\alpha$  previene el aumento en la longitud de neuritas de neuronas derivadas de células madre, provocada por despolarización. Evidencias adicionales del papel de la APP en neuritas se han obtenido a partir del estudio de modelos *in vivo*: Ratones mutantes APP/APLP1/APLP2 muestran una alta incidencia de displasia cortical (Herms *et al.*, 2004). La electroporación *in utero* de shRNAi de APP en progenitores corticales resulta en una migración defectuosa de neuronas corticales. Estas células se diferencian prematuramente y forman una heterotopia permanente bajo la placa cortical. Este estudio parece mostrar el efecto contrario al visto en el análisis con ratones *knockout*. Sin embargo ambos apoyan la idea de que la APP juega un papel cuantitativo en la migración neuronal (Young-Pearse *et al.*, 2007). Además, este estudio aporta pruebas de que Dab1, un adaptador que forma parte de la señalización por tirosina-quinasa Abl, actúa de manera subsecuente al APP, sugiriendo que la señalización por Abl puede ser un efector clave de la señalización por APP en neuronas corticales. La pérdida de APP durante el desarrollo cortical también provoca un crecimiento dendrítico defectuoso: ratones KO para APP poseen menor número de dendritas y de menor longitud (Hoe *et al.*, 2009), de manera similar a los ratones KO para reelina. La interacción entre APP y reelina también es crítica para el crecimiento dendrítico en cultivos primarios de neuronas hipocámpicas, mediada probablemente por integrinas. Otro estudio (Young-Pearse *et al.*, 2008) afirma que el sAPP $\alpha$  es capaz de bloquear la interacción entre APP y la integrina  $\beta 1$ , lo cual inhibe la actividad promotora del crecimiento de la integrina  $\beta 1$ . Estos resultados son de especial interés ya que sugieren que diferentes formas de la APP pueden tener efectos diferentes e incluso contrarios.

Todos estos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* describen al APP como un co-transductor de varias señales de motilidad neuronal hacia el citoesqueleto, actuando como un co-receptor de señales de guía axonal y migración celular.



### **Formación y función de las sinapsis**

Otro paso muy importante en el desarrollo del circuito neuronal es el establecimiento de conexiones sinápticas y existen numerosos estudios que demuestran la importancia de la APP en la formación de sinápsis en la unión neuromuscular.

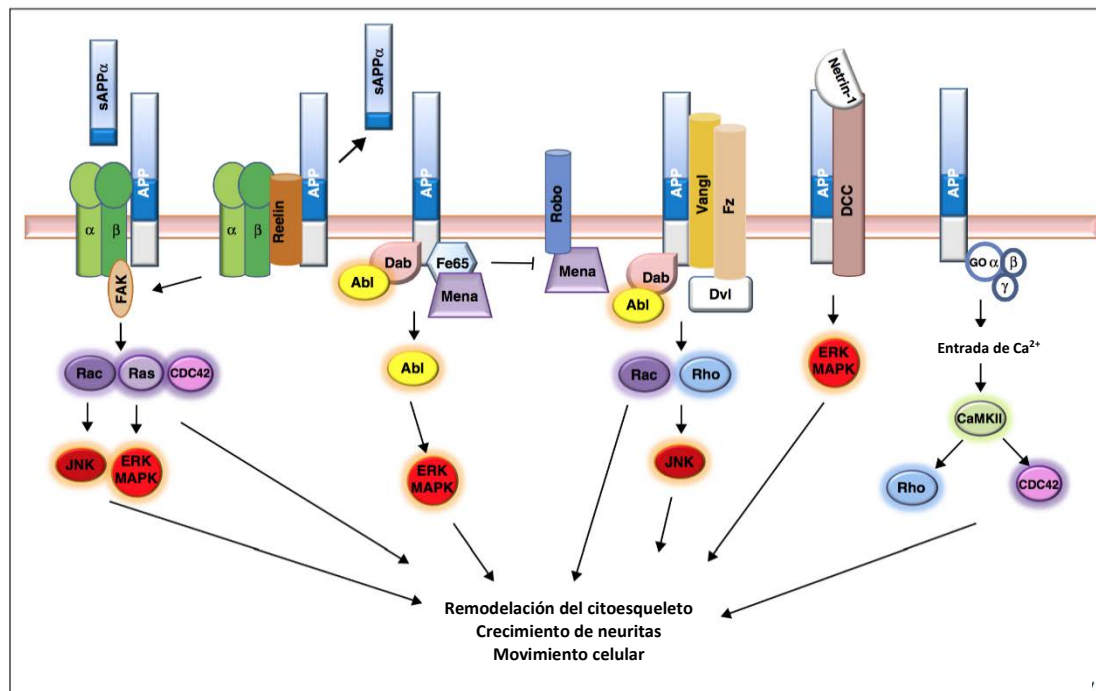
En mamíferos, la APP es necesaria en neuronas motoras y músculos para asegurar una unión neuromuscular funcional, donde la APP pre- y post-sináptica cooperan para modular la estructura y la funcionalidad de dicha unión (Wang *et al.*, 2009). Esto también se ha observado en pez zebra y *Drosophila*, donde una reducción de AP+P $\beta$  y APPL, respectivamente, resulta en una densidad alterada de sitios pre- y post-sinápticos en la unión neuromuscular. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares que subyacen a esta función. En el sistema nervioso central, la deficiencia de APP disminuye el número de espinas dendríticas (Tyan *et al.*, 2012). Esto se correlaciona con un deterioro en la potenciación a largo plazo (LTP). Este deterioro puede ser reducido por sAPP $\alpha$  pero no por sAPP $\beta$  (el fragmento secretado de la APP, generado tras su procesamiento por la  $\beta$ -secretasa), demostrando las diferentes funciones de los distintos productos de la APP. Además, la infusión, mediante una cánula, de sAPP $\alpha$  en el cortex frontal de ratones, conlleva un aumento en el número de botones presinápticos corticales (Bell *et al.*, 2008). Un efecto similar se observa en ratones transgénicos que sobreexpresan la  $\alpha$ -secretasa ADAM10, sugiriendo que el procesamiento no amiloidogénico de la APP promueve la formación de sinapsis. Pero, aunque parece evidente que la APP juega un papel importante en la regulación de la formación de sinapsis, aún queda mucho camino para poder clarificar las cascadas de señalización implicadas en estos procesos.

### **Mecanismos moleculares de la actividad del APP**

La literatura mencionada hasta ahora sugiere mecanismos comunes de señalización que median las funciones de la APP. Cada vez hay más evidencias que sugieren que tanto la APP como sus diferentes formas secretadas poseen relevancia fisiológica y pueden actuar en dianas comunes, a veces con efectos opuestos (Young-Pearse *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios sobre los

efectores que median las acciones de la APP, sugieren que esta proteína regula cascadas que finalmente resultan en la modificación del citoesqueleto (Figura 6). Varios estudios subrayan la conexión entre APP e integrina  $\beta$ . Se ha visto que la APP se encuentra colocalizada con integrinas en diferentes contextos (Yamazaki *et al.*, 1997) e interaccionando físicamente con ellas (Hoe *et al.*, 2009; Young-Pearse *et al.*, 2008). Las integrinas están involucradas en crecimiento neurítico, adhesión y migración celular y conectan la matriz extracelular con el entorno intracelular, dando lugar al reordenamiento del citoesqueleto. Curiosamente, la Integrina  $\beta 1$ , junto con la reelina, disminuyen significativamente la internalización del APP y aumentan su presencia en la membrana y su subsecuente secreción (Hoe *et al.*, 2009). Este mecanismo, junto con la evidencia de que el sAPP $\alpha$  compete con la APP para unirse a la Integrina  $\beta 1$ , sugiere la presencia de un bucle de retroalimentación positivo. Otro efector que ya ha sido descrito en varias ocasiones como modulado directa o indirectamente por la APP es la tirosina quinasa Abl. Esta quinasa está involucrada en la polimerización de la actina y su sustrato Mena regula la arquitectura de los lamelipodios y de la actina. APP y la proteína FE65 están presentes en las regiones móviles de los conos de crecimiento e incrementan la motilidad celular (Sabo *et al.*, 2001). El hecho de que estas dos proteínas colocalicen con Mena, la cual regula por sí misma la motilidad celular, apoyan la hipótesis de que APP y FE65 regulan dicha motilidad como parte de un complejo macromolecular mayor. Además, la proteína adaptadora Dab1, que interviene en la cascada de señalización de Abl, actúa también, por debajo de la APP, modulando la migración cortical (Young-Pearse *et al.*, 2007). En *Drosophila*, la APPL puede inducir arborización axonal (Leyssen *et al.*, 2005) y esta función requiere Abl. Finalmente, la APPL modula la señalización Wnt-PCP mediante la fosforilación de la proteína Dishevelled (Dsh) por Abl. Todos estos datos sugieren que Abl es un modulador fundamental en la señalización de APP hacia el citoesqueleto en respuesta a señales externas. Otro dato interesante es que la APP parece actuar como co-receptor en respuesta a netrina-1 (Rama *et al.*, 2012). En presencia de netrina-1 la APP interacciona con DCC aumentando la señalización por ERK1/2 mediada por DCC. Finalmente, la APPL en la *Drosophila* interacciona con la proteína G heterotrimérica G $\alpha$ , sugiriendo que la APPL puede

actuar como un receptor acoplado a  $G\alpha$  (Ramaker *et al.*, 2013). Las proteínas G heterotriméricas transducen señales desde la membrana hasta el citoesqueleto dando lugar a cambios en la motilidad celular y el crecimiento neurítico (Dave *et al.*, 2009). Otro candidato interesante para actuar como efector o modulador del APP es la quinasa c-Jun N-terminal (JNK). La señalización vía JNK es importante en diversos procesos de desarrollo y se ha visto que es necesaria para el efecto de la sobreexpresión de APP en *Drosophila* (Leyssen *et al.*, 2005). Estudios previos en ratones y moscas demuestran que JNK es el efector final de PCP en el crecimiento axonal. La fosforilación del dominio intracelular de la APP mediado por JNK se ha visto implicado en la regulación de la localización de APP en conos de crecimiento y neuritas (Muresan *et al.*, 2005). Curiosamente la expresión de APP y la activación de JNK son co-inducidas bajo situaciones de estrés o de lesión, sugiriendo que los pacientes de Alzheimer pueden presentar una menor tolerancia a estrés cerebral, lo cual conduce al desarrollo de la enfermedad.



**Figura 6.** El APP puede actuar como co-receptor transduciendo diversas señales extracelulares que convergen en quinasas dando lugar a una regulación del citoesqueleto neuronal. Adaptado de Soldano *et al.*, 2014.

### **2.3.2 Procesamiento de la APP**

La proteína precursora de amiloide APP es sintetizada en el retículo endoplasmático y luego es transportada a través del aparato de Golgi hasta la región trans-Golgi, donde se encuentra la mayor concentración de APP en neuronas (Xu *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1997; Greenfield *et al.*, 1999). El péptido A $\beta$  es generado en el retículo endoplasmático y en el Golgi/trans-Golgi (Greenfield *et al.*, 1999). Desde el trans-Golgi, la APP puede ser transportada en vesículas secretoras a la superficie celular donde puede ser escindida por la  $\alpha$ -secretasa dando lugar a una molécula soluble sAPP $\alpha$  (Sisodia, 1992) o puede ser reinternalizada por una vía de degradación endosomal/lisosomal (Nordstedt *et al.*, 1993; Caporaso *et al.*, 1994). También se ha propuesto que la A $\beta$  pueda ser generada en el sistema lisosomal/endosomal (Haass *et al.*, 1993). Mientras que el péptido A $\beta$  es neurotóxico, existen estudios que sugieren que el sAPP $\alpha$  es neuroprotector (Furukawa *et al.*, 1996; Mattson *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2005), por lo que el procesamiento diferencial del APP puede ser un factor crucial en la neurodegeneración.

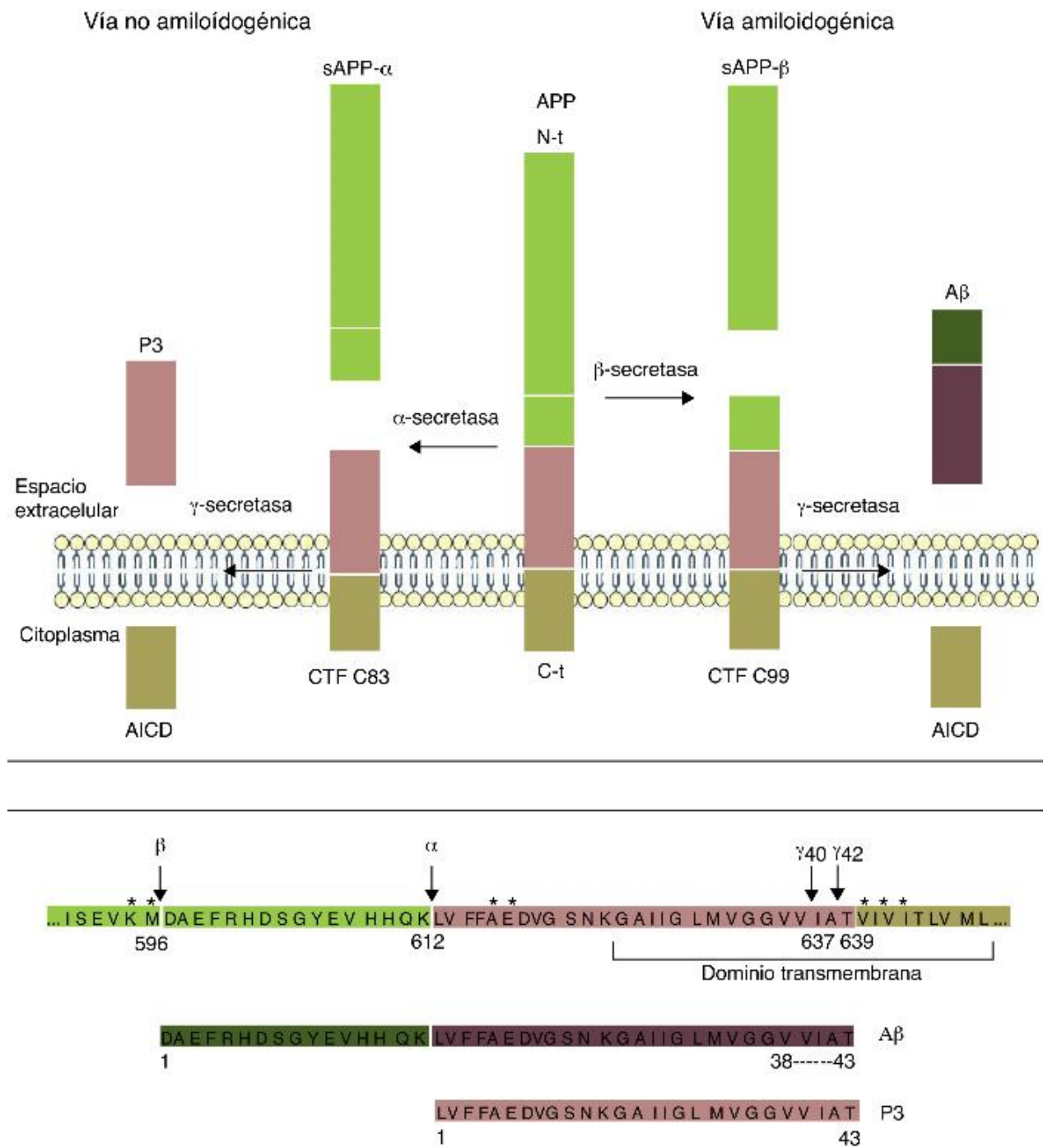


Figura 7. Representación esquemática del procesamiento diferencial de la APP y los diferentes productos obtenidos.

### **$\alpha$ -secretasa y vía no amiloidogénica**

El procesamiento del APP por la  $\alpha$ -secretasa evita la generación del péptido A $\beta$  ya que el sitio de ruptura de esta proteasa se encuentra dentro del dominio A $\beta$  (entre Lys16-Leu17) (Figura 7). Este procesamiento libera un ectodominio soluble grande llamado sAPP $\alpha$ , quedando unido a la membrana un fragmento carboxilo-terminal (CTF) de la APP, de 83 aminoácidos de longitud, denominado  $\alpha$ CTF o C83 (Figura 7). La generación de este sAPP $\alpha$  es un evento constitutivo, pero también puede ser regulado por diversos factores. Los primeros estudios sugerían que la  $\alpha$ -secretasa era una endoproteasa unida a membrana que procesa el APP fundamentalmente en la membrana plasmática (Sisodia, 1992). Utilizando un rango de inhibidores de proteasas se ha determinado que la  $\alpha$ -secretasa es una zinc-metaloproteínasa (Roberts *et al.*, 1994). Varios miembros de la familia ADAM (desintegrina y metaloproteínasa) poseen una actividad tipo  $\alpha$ -secretasa y tres de ellas han sido propuestas como la  $\alpha$ -secretasa responsable de este proceso: ADAM9, ADAM10 y ADAM17. Al igual que APP, todas ellas son proteínas transmembrana tipo I.

ADAM17 (también llamada enzima convertidora del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o TACE) puede ser escindida proteolíticamente para liberar su dominio extracelular como TGF- $\alpha$  soluble. (Black *et al.*, 1997). En células ADAM17-deficientes el procesamiento  $\alpha$  regulado de la APP se ve abolido, lo que sugiere que esta proteasa es probablemente la  $\alpha$ -secretasa responsable de la escisión regulada del APP (Buxbaum *et al.*, 1998). Además, un inhibidor de ADAM17 previno la actividad  $\alpha$ -secretasa regulada en neuronas humanas (Blacker *et al.*, 2002), mientras que el uso de un RNA de interferencia (RNAi) para ADAM10 no tuvo ningún efecto sobre el procesamiento  $\alpha$  de la APP (Kuhn *et al.*, 2002). Varios estudios más confirman que ADAM17 afecta a la vía de procesamiento  $\alpha$  regulada (que no constitutiva) en varias líneas celulares (Merlos-Suarez *et al.*, 2001).

La co-expresión de ADAM9 con APP promovió la producción de sAPP $\alpha$  tras el tratamiento con un éster de forbol, sugiriendo que ADAM9 posee una actividad  $\alpha$ -secretasa (Koike *et al.*, 1999). Sin embargo, el uso de un RNAi para

ADAM9 no tuvo ningún efecto sobre la formación de sAPP $\alpha$ , demostrando que ADAM9 sólo está implicada en el procesamiento  $\alpha$  regulado, no constitutivo.

La sobreexpresión de ADAM10 aumenta el procesamiento  $\alpha$ , mientras que la expresión de una forma dominante negativa de ADAM10 o el uso de un RNAi para ADAM10, inhibe la actividad  $\alpha$ -secretasa endógena en varias líneas celulares, incluyendo neuronas primarias murinas (Lammich *et al.*, 1999; Lopez-Perez *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2010). Muy significativo es el hecho de que la formación de sAPP $\alpha$  fue prácticamente abolida en ratones knockout condicionales para ADAM10 neural (Jorissen *et al.*, 2010). Niveles muy reducidos de ADAM10 en plaquetas de pacientes esporádicos de Alzheimer también se correlacionaron con niveles significativamente inferiores de sAPP $\alpha$  encontrados en sus plaquetas y líquido cefalorraquídeo y con una actividad  $\alpha$ -secretasa muy reducida en homogeneizados de cortex temporal (Tyler *et al.*, 2002). Estos estudios sugieren que ADAM10 es la  $\alpha$ -secretasa constitutiva que es activa en la superficie celular, aunque también puede haber alguna redundancia funcional en la actividad  $\alpha$ -secretasa dentro de la familia ADAM.

Al contrario que A $\beta$ , el fragmento sAPP $\alpha$  juega un papel importante en la supervivencia y plasticidad neuronal, y es neuroprotector frente a excitotoxicidad (Furukawa *et al.*, 1996; Mattson *et al.*, 1997). El sAPP $\alpha$  también inhibe el estrés inducido por la activación de CDK5 y participa en numerosos procesos neuroprotectores (Han *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009; Marcade *et al.*, 2008; Levites *et al.*, 2003). Curiosamente, la expresión de sAPP $\alpha$  por sí solo es capaz de evitar las anomalías presentes en ratones deficientes en APP (Ring *et al.*, 2007), lo cual sugiere que la mayoría de las funciones fisiológicas de esta proteína son medidas por sAPP $\alpha$ .

### **$\beta$ -secretasa y vía amiloidogénica**

El primer paso en la generación del péptido A $\beta$  es la proteólisis de la APP por la  $\beta$ -secretasa. En los años 1999-2000, varios grupos identificaron a BACE1 (también llamada Asp2 o memapsina2) como la principal  $\beta$ -secretasa. BACE1 es una aspartil-proteasa de membrana, con un característico dominio

transmembrana tipo I cerca del extremo C-terminal (Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2000). La sobreexpresión o inhibición de BACE1 induce o inhibe, respectivamente, el procesamiento de APP en los sitios  $\beta$  conocidos, Asp1 y Glu11. Estudios *in vitro* con APP sintético confirman esta escisión por parte de BACE1. Estos resultados proporcionan evidencias de que BACE1 es la  $\beta$ -secretasa involucrada en el metabolismo de la APP (Cai *et al.*, 2001) y se cree que la actividad de BACE1 es el factor limitante en la formación de A $\beta$  a partir de APP.

Un precursor de mayor tamaño, pro-BACE1, es modificado por glicosilación y fosforilación y es escindido por parte de una endoproteasa tipo furina para producir BACE1 maduro (Creemers *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2000). BACE1 requiere de un ambiente ácido para una actividad óptima y al sobreexpresar BACE1 en varias líneas celulares pre-mitóticas se observó que se localiza mayoritariamente en el Golgi temprano, Golgi tardío/endosomas tempranos y endosomas que proporcionan este ambiente ácido. Además, BACE1 también se puede encontrar en la superficie celular (Walter *et al.*, 2001; Huse *et al.*, 2000; Huse *et al.*, 2002). Los mecanismos que regulan el transporte y la actividad de BACE1 aún no se han dilucidado completamente. En algunos estudios se observa que BACE1 puede interactuar con proteínas reticulon/Nogo, cuya expresión incrementada puede bloquear BACE1 en el retículo endoplasmático con un ambiente de pH neutro y por tanto inhibir así su actividad y la producción de A $\beta$  (He *et al.*, 2002; Murayama *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Por otra parte, también se ha visto que proteínas GGA (Golgi localized  $\gamma$ -ear-containing ARF-binding) interactúan con BACE1 y regulan su transporte entre el Golgi y los endosomas tempranos y que una disminución en los niveles de estas proteínas aumenta la acumulación de BACE1 en endosomas tempranos ácidos lo que conlleva una mayor estabilidad de BACE1 y un mayor procesamiento  $\beta$  del APP (He *et al.*, 2005; Tesco *et al.*, 2007; Wahle *et al.*, 2005).

El posible papel de BACE1 como diana terapéutica ha sido estudiado en numerosas ocasiones. Uno de los primeros estudios sugería que ratones knockout para BACE1 no producían niveles apreciables de A $\beta$  y no presentaban un fenotipo anormal (Lou *et al.*, 2001). En un modelo de ratones de Alzheimer se ha visto que



la deficiencia en BACE1 evita la disfunción colinérgica, la pérdida neuronal y los problemas de memoria, todo ello correlacionado con una disminución dramática en los niveles de A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 (Ohno *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2007). Además, varios estudios han demostrado que los niveles de proteína BACE1 y su actividad se encuentran elevados en las zonas del cerebro afectadas por Alzheimer (Yang *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2005). Todos estos resultados sugieren que BACE1 puede ser una buena diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, algunos estudios más recientes han encontrado algunos rasgos fenotípicos anormales en ratones KO para BACE1. Dominguez y cols. (2005) observaron que un número variable pero significativo de ratones murieron en las primeras semanas después de nacer. Estos ratones KO para BACE1 eran más pequeños e hiperactivos y presentaban alteraciones electrofisiológicas en la inactivación de sus canales de sodio dependiente de voltaje. También sufrían de hipomielinización en nervios periféricos y tenían comportamientos neurológicos alterados probablemente debidos a un menor procesamiento de la neuregulina en ausencia de BACE1, ya que la neuregulina1 es otro sustrato de BACE1 (Hu *et al.*, 2006; Willem *et al.*, 2006). Además, se han identificado otros sustratos de BACE1, incluido la subunidad  $\beta$ 2 del canal de sodio activado por voltaje (Nav1), la  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa (localizada en Golgi y unida a membrana), PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), etc. Por lo tanto, quizá BACE1 no sea una diana terapéutica tan segura como se pensó al principio.

BACE2 es un homólogo de BACE1 localizado en 21q22.3, una región crítica en el síndrome de Down. Como también se observa un acúmulo de A $\beta$  en este síndrome, la localización de este gen sugiere una asociación entre BACE2 y el procesamiento de APP. De hecho, en estudios enzimáticos *in vitro* se ha observado que BACE2 también procesa sustratos de la  $\beta$ -secretasa, como la APP (tanto la forma salvaje como la que porta la mutación sueca), de manera parecida a BACE1 (Hussain *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión de BACE2 en neuronas es sustancialmente menor que la expresión de BACE1 (Bennett *et al.*, 2000b), y además BACE2 escinde el APP cerca del sitio del procesamiento  $\alpha$  de una manera mucho más eficaz que cerca del sitio  $\beta$  (Yan *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que BACE1 es la  $\beta$ -secretasa principal pero no excluyen una posible

contribución de BACE2 en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Mientras que los ratones KO para BACE2 son sanos, un déficit en BACE1 y BACE2 aumenta la letalidad del KO para BACE1, sugiriendo una ligera redundancia funcional (Dominguez *et al.*, 2005).

Además de BACE1 y BACE2, también se ha propuesto que la catepsina B actúe como una  $\beta$ -secretasa adicional. Se ha visto que la inhibición de esta enzima reduce la producción de A $\beta$  tanto *in vitro* como *in vivo* (Hook *et al.*, 2005; Hook *et al.*, 2009). Sin embargo, se necesitarían más estudios para confirmar que la catepsina B realmente ejerce una actividad  $\beta$ -secretasa fisiológica.

Tras el procesamiento  $\beta$ , el ectodominio de la APP también es liberado como una forma soluble sAPP $\beta$ . A pesar de que sAPP $\beta$  solo se diferencia de sAPP $\alpha$  en que no posee la región A $\beta$ 1-16 en el extremo C-terminal (Figura 7), el sAPP $\beta$  ha sido descrito como ligando del receptor de muerte 6 y media la eliminación de sinapsis (o “pruning”) y la muerte neuronal (Nikolaev A *et al.*, 2009).

Los fragmentos carboxilo terminales (CTFs) del APP, formados en los procesamientos  $\alpha$  y  $\beta$  y conocidos como  $\alpha$ CTF y  $\beta$ CTF, respectivamente, se mantienen unidos a la membrana y serán escindidos nuevamente por la  $\gamma$ -secretasa. Estos CTFs son productos intermedios por lo que su función ha sido mucho menos caracterizada. Sin embargo, se ha visto que la sobreexpresión de  $\beta$ CTF es citotóxica y provoca degeneración neuronal, quizás interfiriendo en la transducción de la señal de la APP (Yankner *et al.*, 1989; Oster-Granite *et al.*, 1996). También es posible que el efecto citotóxico de  $\beta$ CTF sea mediado por los productos finales del procesamiento por la  $\gamma$ -secretasa o por caspasas, incluyendo el dominio intracelular del APP (AICD), C31 y Jcasp que son citotóxicos. Recientemente se ha visto que el  $\beta$ CTF puede regular el transporte a membrana de la  $\gamma$ -secretasa, quizás a través de la unión enzima-sustrato (Liu *et al.*, 2009). Es posible que  $\alpha$ CTF posea un efecto similar ya que también es un sustrato de la  $\gamma$ -secretasa.

### **$\gamma$ -secretasa**

Tanto  $\alpha$ CTF como  $\beta$ CTF, los fragmentos carboxilo terminales que quedan unidos a la membrana tras la escisión de la APP por la  $\alpha$ - o  $\beta$ -secretasa, sufren un

procesamiento posterior por la  $\gamma$ -secretasa para dar lugar a p3 y A $\beta$ , respectivamente (Figura 7). El fragmento p3 es degradado rápidamente y se cree que no posee ninguna función importante. La proteólisis por la  $\gamma$ -secretasa es única en cuanto a que el sitio de ruptura se encuentra en el dominio transmembrana, aunque el lugar específico puede variar. La  $\gamma$ -secretasa puede dar lugar tanto a un péptido amiloide de 40 aminoácidos A $\beta$ 40 (la especie mayoritaria) como a uno de 42 A $\beta$ 42 (la especie más amiloidogénica), además de liberar el dominio intracelular de la APP (AICD). Datos recientes sugieren que la PS/ $\gamma$ -secretasa también media la ruptura en los sitios de procesamiento  $\zeta$  (A $\beta$ 46) y  $\epsilon$  (A $\beta$ 49) (Sastre *et al.*, 2001; Weidemann *et al.*, 2002), sugiriendo un modelo de procesamiento secuencial donde la proteólisis en el sitio  $\epsilon$  es seguida de proteólisis en los sitios  $\zeta$  y  $\gamma$ . Existe mucha evidencia de que la actividad  $\gamma$ -secretasa reside en un complejo de elevado peso molecular, compuesto por al menos cuatro componentes: presenilinas (PS, PS1 o PS2), nicastrina, APH-1 y PEN-2 (Kimberley *et al.*, 2003; Takasugi *et al.*, 2003). En mamíferos existen dos presenilinas homólogas, PS1 y PS2. Mutaciones en estos dos genes, especialmente en PS1, son causantes de la mayoría de los casos de Alzheimer familiar (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). Las presenilinas son proteínas multitransmembrana con un número indefinido de dominios transmembrana. Las presenilinas sufren procesamiento endoproteolítico dando lugar al fragmento N-terminal (NTF) y el fragmento C-terminal (CTF) formando un heterodímero funcional (Borchelt *et al.*, 1996). Estas proteínas poseen dos residuos de Asp altamente conservados imprescindibles para la actividad  $\gamma$ -secretasa. Los heterodímeros NTF/CTF de PS1 se unen a inhibidores análogos del estado de transición de la  $\gamma$ -secretasa, lo cual sugiere que las PS son los componentes catalíticos cruciales de la  $\gamma$ -secretasa. Esta idea ha sido confirmada recientemente por estudios realizados *in vitro* (Li *et al.*, 2000). La nicastrina, el primer cofactor de la presenilina en ser identificado es una glicoproteína transmembrana tipo I y es considerada la proteína de andamiaje del complejo  $\gamma$ -secretasa. Un estudio demostró que el ectodominio de nicastrina se une a APP y Notch y los puede reclutar al complejo  $\gamma$ -secretasa, sugiriendo que la nicastrina puede actuar como el receptor de la  $\gamma$ -secretasa (Luo *et al.*, 2003). Otros dos

componentes, APH1 y PEN2 fueron identificados mediante el screening genético de *Caenorhabditis elegans* (Francis *et al.*, 2002; Goutte *et al.*, 2002). APH1 interacciona con nicastrina para formar un intermedio estable en un estado temprano de ensamblaje del complejo  $\gamma$ -secretasa. PEN2 regula la endoproteólisis de PS (Ahn *et al.*, 2010). Cada uno de estos cuatro componentes son necesarios para la actividad enzimática del complejo, y un déficit en cualquiera de ellos disminuye de manera dramática la actividad  $\gamma$ -secretasa. La coexpresión de los cuatro componentes en *Saccharomyces cerevisiae* es necesaria y suficiente para reconstituir la actividad  $\gamma$ -secretasa, que no es endógena en la levadura (Edbauer *et al.*, 2003; Greenfield *et al.*, 1999). Además de estos cuatro componentes críticos se ha propuesto que existen otros factores que actúan como componentes adicionales de la  $\gamma$ -secretasa. Sin embargo, estos factores jugarían un papel modulador y no son esenciales para su actividad: CD147 es una glicoproteína transmembrana e interacciona con los cuatro componentes esenciales de la  $\gamma$ -secretasa. Una disminución en sus niveles aumenta la producción de A $\beta$ , pero su sobreexpresión no tiene ningún efecto sobre la generación del péptido  $\beta$ -amiloide (Zhou *et al.*, 2005). TM21/p23 se une al complejo  $\gamma$ -secretasa a través de su dominio transmembrana y regula la proteólisis  $\gamma$ , pero no la  $\epsilon$  (Chen *et al.*, 2006; Pardossi-Piquard *et al.*, 2009). Sin embargo, otro estudio no fue capaz de demostrar la unión de TMP21/p23 a la  $\gamma$ -secretasa y en cambio sugería que TMP21/p23, que pertenece a la familia de proteínas p24 involucradas en la regulación del transporte vesicular, influye en el transporte de APP y por tanto en la generación de A $\beta$  (Vetrivel *et al.*, 2007). Recientemente se ha identificado una nueva proteína activadora de  $\gamma$ -secretasa (GSAP) que aumenta la producción de A $\beta$  de manera selectiva interaccionando tanto con la  $\gamma$ -secretasa como con su sustrato APP CTF (He *et al.*, 2010).

Existen muchas pruebas de que el complejo  $\gamma$ -secretasa se encuentra principalmente en el retículo endoplasmático, Golgi/TGN y compartimentos endocíticos e intermedios, la mayoría de los cuales (excepto el TGN) no son localizaciones subcelulares para APP (Cupers *et al.*, 2001; Kovacs *et al.*, 1996). Además de procesar los fragmentos CTFs del APP, la  $\gamma$ -secretasa también escinde una serie de importantes proteínas transmembrana, incluidas Notch

(Haass *et al.*, 1999), cadherina (Chen *et al.*, 2006), tirosinasa (Wang *et al.*, 2006), ErbB4 (Luo *et al.*, 2001), CD44 (Walter *et al.*, 2001), etc. La escisión de varios sustratos depende del compartimento subcelular, APP es escindida principalmente en el TGN y dominios endosomales tempranos, mientras que Notch sufre su procesamiento en la membrana plasmática (Xu *et al.*, 1997; Greenfield *et al.*, 1999; Tarassishin *et al.*, 2004). Por tanto, alteraciones en la localización del complejo  $\gamma$ -secretasa pueden jugar un papel importante en la producción de A $\beta$  y en la patogénesis de AD.

La  $\gamma$ -secretasa puede liberar los dominios intracelulares (ICDs) de sus sustratos. Se sabe que el dominio intracelular de Notch (NICD) se transloca al núcleo y regula genes cruciales para el desarrollo (Kopan *et al.*, 1996; Schroeter *et al.*, 1998). Otros dominios intracelulares pueden tener la misma relevancia. Por ejemplo, el dominio intracelular de ErbB4 se une a promotores astrocíticos para suprimir su expresión (Sardi *et al.*, 2006). De manera similar, se ha visto que el AICD posee actividad transactivasa y puede regular la transcripción de múltiples genes incluyendo *APP*, *GSK3 $\beta$* , *KAI1*, *neprilisina*, *BACE1*, *p53*, *EGFR* y *LRP1* (Baek *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; von Rotz *et al.*, 2004; Pardossi-Piquard *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Además, el AICD libre puede inducir apoptosis y jugar un papel en la sensibilización de las neuronas a estímulos tóxicos (Kinoshita *et al.*, 2002; Giliberto *et al.*, 2008). Sin embargo, una función muy importante de AICD (como dominio intracelular de APP) es facilitar la interacción de la APP con varios factores citosólicos que regulan su transporte y/o su función en la transducción de señal. Curiosamente, parece que la interacción, mediada por AICD, entre la APP y diversos factores es controlada por el grado de fosforilación de AICD (Tamayev *et al.*, 2009).

### **Procesamiento por las caspasas**

Además de las secretasas, las caspasas (predominantemente la caspasa-3) pueden, durante la apoptosis, escindir directamente el APP en su cola citoplasmática, en la posición Asp664 (basada en la secuencia APP695), para liberar un fragmento que contiene los últimos 31 aminoácidos de la APP, llamado C31. La acción sucesiva de la  $\gamma$ -secretasa genera un fragmento, llamado Jcasp,

que contiene la región entre los sitios de ruptura  $\gamma$  y de caspasa (Park *et al.*, 2009; Gervais *et al.*, 1999; Bredesen *et al.*, 2009). Aunque en un inicio se vio que la escisión por parte de la caspasa afecta al procesamiento amiloidogénico del APP (Gervais *et al.*, 1999), estudios posteriores sugieren que no es así (Soriano *et al.*, 2001). Sin embargo, durante el proceso de neurotoxicidad inducido por A $\beta$ , las caspasas activas escinden la APP para generar C31 y Jcasp, los cuales también son neurotóxicos iniciando así una cascada (Lu *et al.*, 2003). Un posible mecanismo para la toxicidad producida por C31 es que este fragmento se acompleje con APP para reclutar a otros factores que inician las señales relacionadas con toxicidad celular (Park *et al.*, 2009). Comparado con C31, Jcasp parece jugar un papel menor en la citotoxicidad (Park *et al.*, 2009). En cualquier caso, el procesamiento por caspasas de la APP parece ser importante en la neurotoxicidad mediada por A $\beta$  ya que una mutación en la posición Asp664 que inhibe esta escisión en ratones transgénicos evitó las anormalidades en sinapsis, electrofisiología y comportamiento, a pesar de seguir presentando estos animales abundantes placas de A $\beta$  en el cerebro (Galvan *et al.*, 2006).

### **Función del péptido $\beta$ -amiloide A $\beta$**

El efecto neurotóxico del A $\beta$  es bien conocido. Muchas líneas de investigación demuestran que la sobreproducción del péptido  $\beta$ -amiloide provoca una cascada neurodegenerativa que lleva a disfunción sináptica, formación de ovillos neurofibrilares y, finalmente, muerte neuronal en las regiones afectadas del cerebro (Selkoe *et al.*, 1998; Shankar *et al.*, 2009). Existen dos especies tóxicas principales, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, siendo ésta última más hidrofóbica y propensa a formar fibras, a pesar de que solo representa el 10% de la producción de péptido  $\beta$ -amiloide (Burdick *et al.*, 1992). Estudios realizados sobre mutaciones de Alzheimer Familiar muestran un aumento consistente en el ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Dawson *et al.*, 1999; Scheuner *et al.*, 1996). Esto sugiere que niveles elevados de A $\beta$ 42, en relación a los niveles de A $\beta$ 40, son críticos para la patogénesis de la enfermedad, ya que probablemente sirvan de núcleo para el ensamblaje del A $\beta$  en oligómeros, fibrillas y placas amiloidogénicas (Jarrett *et al.*, 1993; Iwatsubo *et al.*, 1994).

A pesar de que la mayoría del A $\beta$  es secretado fuera de la célula, también puede ser generado en varios compartimentos subcelulares en el interior de la célula, como el retículo endoplasmático, Golgi/TGN y endosomas/lisosomas. Además, el A $\beta$  extracelular puede ser internalizado por la célula para su degradación. La existencia de A $\beta$  intracelular implica que se puede acumular dentro de las neuronas y contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Esto se ha confirmado con estudios de inmunofluorescencia en los que se ha visto inmunoreactividad intraneuronal frente al A $\beta$  en regiones hipocampales y entorhinales propensas a presentar una patología AD temprana en pacientes con deterioro cognitivo leve (Gouras *et al.*, 2000). En pacientes con síndrome de Down, el acúmulo de A $\beta$  intracelular precede a la formación de placas extracelulares (Gyure *et al.*, 2001) y el nivel de A $\beta$  intraneuronal disminuye al acumularse las placas extracelulares (Mori *et al.*, 2002). Estudios con ratones transgénicos confirman estos resultados revelando que la acumulación de A $\beta$  intracelular es un evento temprano en el fenotipo neuropatológico, con una disminución en los niveles intraneuronales al irse formando las placas extracelulares (Oddo *et al.*, 2003; Oddo *et al.*, 2006; Oakley *et al.*, 2006). El A $\beta$  intraneuronal también puede perjudicar a las respuestas emocionales dependientes de la amígdala al interferir en la cascada de señalización de las ERK/MAPK (Espana *et al.*, 2010). Se vio que una inhibición de la internalización de A $\beta$  mediada por dinamina (pero no de la mediada por clatrina) redujo la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  (Yu *et al.*, 2010). Un estudio reciente sugiere que el A $\beta$  internalizado puede agregar dentro de la célula y desorganizar la membrana vesicular, contribuyendo así a su efecto patológico (Friedrich *et al.*, 2010).

El péptido A $\beta$  fue considerado originalmente como una especie anormal y tóxica que solo se encontraba en el cerebro de humanos ancianos o enfermos. Sin embargo, el descubrimiento de especies solubles de este péptido en fluidos corporales de diferentes especies (Seubert *et al.*, 1992) y en el medio condicionado de células en cultivo (Haass *et al.*, 1992) rebata este concepto e implica una función fisiológica del A $\beta$ . Aunque un exceso del péptido provoca disfunción sináptica y pérdida de sinapsis, bajos niveles de A $\beta$  incrementan la

potenciación a largo plazo hipocampal y aumentan la memoria, indicando un nuevo papel modulador positivo de este péptido sobre la neurotransmisión y la memoria (Puzzo *et al.*, 2008; Morley *et al.*, 2010). Un estudio usando un modelo transgénico de *Caenorhabditis elegans* mostró que la agregación del A $\beta$  intracelular en células musculares puede atrapar el exceso de cobre libre y reducir la citotoxicidad mediada por cobre (Minniti *et al.*, 2009). Sin embargo, todavía queda por aclarar si el A $\beta$  puede formar agregados intracelulares en células periféricas humanas para ejercer una función fisiológica protectora.

### **3. PROTEÍNA GSK-3**

La enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), originalmente nombrada así debido a su papel central en el metabolismo del glucógeno, es una serina/treonina quinasa con funciones clave en multitud de procesos. Constituye una etapa central en muchas vías de señalización y regula importantes efectos a nivel celular. Entre ellos, destaca su importancia dentro de los sistemas de señalización acoplados a factores de crecimiento como la insulina, y su participación dentro de la vía de Wnt, esencial para el desarrollo embrionario, además de su papel regulador en la síntesis proteica, la proliferación, diferenciación, motilidad celular, dinámica de microtúbulos y apoptosis. Igualmente, está implicada en el correcto funcionamiento a nivel cognitivo del organismo. Todas estas funciones se basan en el gran número de sustratos que es capaz de regular la GSK-3, de los que hasta la fecha se han identificado más de 40, entre los que se encuentran factores de iniciación, elementos del ciclo celular, factores de transcripción y proteínas implicadas en la dinámica de los microtúbulos y adhesión celular, sin olvidar por supuesto, las que participan en la regulación del metabolismo. Estas importantes funciones reguladoras de la GSK-3 llevan asociado el hecho de que sus alteraciones se encuentren unidas a varias situaciones patológicas como diabetes tipo II, trastorno bipolar, enfermedades crónicas inflamatorias, enfermedades autoinmunes, y patologías



neurodegenerativas (Frame y Cohen, 2001; Grimes y Jope, 2001; Jope y Johnson, 2004; McCubrey *et al.*, 2014).

La GSK-3 fue descubierta en 1980 e identificada como una de las proteínas quinasas capaces de actuar sobre la glucógeno sintasa, enzima clave en el metabolismo que regula el paso final de la biosíntesis de glucógeno y que resultaba fosforilada e inactivada por la acción de la GSK-3 (Embi *et al.*, 1980). Purificada a partir del músculo esquelético de conejo (Rylatt *et al.*, 1980), se identificaron en mamíferos dos isoformas, muy relacionadas, la GSK-3 $\alpha$  y la GSK-3 $\beta$  (Woodgett, 1990), a las que más recientemente se uniría la isoforma resultante del procesamiento alternativo de la GSK-3 $\beta$ , la GSK-3 $\beta$ 2 (Mukai *et al.*, 2002). La GSK-3 $\alpha$  y  $\beta$  están codificadas por genes diferentes localizados en 19q13.2 y 3q13.3 respectivamente y poseen unas secuencias casi idénticas en sus dominios catalíticos (97%) situados en la zona central, mientras que fuera de estos dominios las secuencias difieren notablemente. La isoforma  $\alpha$  posee un peso molecular de 51 KDa, mientras que la isoforma  $\beta$  cuenta con un peso molecular de 47 KDa y una secuencia compuesta por 482 aminoácidos, siendo la homología total de aminoácidos entre ambas de un 85% (Embi *et al.*, 1980; Woodgett, 1991; Jope y Johnson, 2004). En cuanto a la variante de la isoforma  $\beta$ , la GSK-3 $\beta$ 2, cuenta con un inserto de 13 aminoácidos en su dominio catalítico consecuencia del procesamiento alternativo (Mukai *et al.*, 2002). GSK-3 es regulada mediante modificaciones postraduccionales como por ejemplo la fosforilación de la Ser9 (inhibición) o de la Tyr216 (activación) de la GSK-3 $\beta$  y de la Ser21 (inhibición) o de la Tyr279 (activación) de GSK-3 $\alpha$  mediante diversas quinasas, incluida Akt, la proteína quinasa A y la proteína quinasa C (Fang *et al.*, 2000).

La GSK-3 se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos con niveles particularmente altos en el cerebro (Woodgett, 1990), en concreto en el hipocampo y especialmente la isoforma GSK-3 $\beta$ . Esta isoforma muestra niveles muy elevados durante el desarrollo, decreciendo posteriormente a partir del día 20 tras el nacimiento, y participando en la formación de sinapsis, migración celular, polarización y desarrollo de neuritas (Leroy y Brion, 1999; Shi *et al.*, 2004). En cuanto a su actividad enzimática una gran parte de sus sustratos requieren de una fosforilación previa, por parte de otra quinasa, para ser reconocidos por la GSK-3

(DePaoli-Roach, 1984; Fiol *et al.*, 1988). Esta fosforilación previa se realiza en n+4 (siendo n el residuo a fosforilar por la GSK-3), dando lugar a un orden “jerárquico” de fosforilaciones. Esto sucede en sustratos como, por ejemplo, la glucógeno sintasa, la ATP-citrato liasa, el factor de iniciación eIF2B, etc. (Fiol *et al.*, 1987; Hughes *et al.*, 1992; Benjamin *et al.*, 1994). El reconocimiento e interacción con el sustrato pre-fosforilado, se lleva a cabo a través de los residuos de arginina 96, 180, o la lisina 205, situados en el dominio catalítico de actividad quinasa de la GSK-3 (Frame *et al.*, 2001). Estos residuos de reconocimiento se encuentran conservados en todos los homólogos de la GSK-3 identificados hasta la fecha (Kim y Kimmel, 2000). Sin embargo, la fosforilación previa no es un paso imprescindible para que la GSK-3 actúe, ya que hay sustratos que contienen una gran variedad de residuos acídicos que son reconocidos por la GSK-3 sin necesidad de este prerequisite (Fiol *et al.*, 1988).

### **3.1 GSK-3 y Enfermedad de Alzheimer.**

La GSK-3 está frecuentemente asociada con los dos principales marcadores del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Como se ha mencionado anteriormente, el primero es intracelular, debido a la formación de los ovillos neurofibrilares por la hiperfosforilación de la proteína tau. El segundo es extracelular, formado como consecuencia de la acumulación del péptido  $\beta$  amiloide (Kaytor y Orr, 2002). El desarrollo temprano de la enfermedad se asocia a varias mutaciones entre las que destacan las de la presenilina 1 y 2 (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995) y el precursor amiloide. Según los conocimientos actuales, parece ser que es la acumulación de los oligómeros tóxicos del péptido amiloide lo que lleva, tanto a la formación de las placas extracelulares, como a la hiperfosforilación de tau, lo que, a su vez, conduce a la disfunción sináptica y la muerte celular (Jope *et al.*, 2007).

La GSK-3 participa activamente en esta patología, ya que promueve la formación del péptido amiloide, reduciéndose ésta considerablemente con el uso de inhibidores selectivos de la GSK-3 (Phiel *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2004). El péptido amiloide, por su parte, incrementa la actividad de la GSK-3 en cultivos celulares (Takashima *et al.*, 1996). Los mecanismos por lo que esto sucede no se conocen

claramente, pero parecen estar relacionados con la capacidad de fosforilación que la GSK-3 ejerce sobre el precursor amiloide (Aplin *et al.*, 1997), al igual que por la interacción que se produce entre la GSK-3 y la presenilina 1 (Takashima *et al.*, 1998). En este sentido, las mutaciones de presenilina 1 asociadas al Alzheimer se unen más fuertemente a la GSK-3 y potencian su actividad (Takashima *et al.*, 1998). Además de estas pruebas, la GSK-3 es capaz de unirse a otros productos que se generan en el procesamiento del péptido amiloide (Kim *et al.*, 2003b; Ryan y Pimplikar, 2005), y su inhibición reduce significativamente la neurotoxicidad inducida por la acumulación de estos péptidos (Alvarez *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000; De Ferrari *et al.*, 2003). Todos estos datos indican los múltiples puntos de regulación en los que puede estar actuando la GSK-3 en este sentido.

Como hemos indicado anteriormente, el otro marcador de la enfermedad de Alzheimer es la formación intracelular de los ovillos neurofibrilares. Estos ovillos se producen como consecuencia de la agregación de las proteínas tau hiperfosforiladas (Kaytor y Orr, 2002). La GSK-3 aumenta su actividad en neuronas que forman estos ovillos y colocaliza con las neuritas distróficas y con los propios ovillos en el cerebro de enfermos de Alzheimer (Pei *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 2004). Las neuronas que sufren degeneración granulovascular y que apoptizan mantienen igualmente una fuerte actividad de la GSK-3 $\beta$  (Leroy *et al.*, 2002). La GSK-3 fosforila a tau en su residuo de Thr231, provocando su separación de los microtúbulos (Cho y Johnson, 2004). Otros residuos de la proteína tau son igualmente fosforilados por GSK-3, muchos de los cuales se encuentran fosforilados en el Alzheimer. Esta hiperfosforilación de tau genera neurotoxicidad por sí misma, aparte de la desestabilización estructural y la alteración en la plasticidad neuronal (Fath *et al.*, 2002). La inhibición de la actividad de GSK-3, en especial de la isoforma  $\beta$  (Phiel *et al.*, 2003), protege a las células de la toxicidad inducida por los agregados de proteína tau hiperfosforilada (Noble *et al.*, 2005).

Por último, se ha descubierto más recientemente que la inflamación promovida por la GSK-3 también puede contribuir a los mecanismos patológicos generados por la enfermedad de Alzheimer (Jope *et al.*, 2007). La acumulación de placas de péptidos amiloides y los ovillos neurofibrilares producen la activación de

los astrocitos y la microglía próximas a las neuronas. Esto genera un efecto beneficioso debido a los factores de crecimiento que secretan y por el aclaramiento de las placas de péptidos A $\beta$  (Nagele *et al.*, 2003; Wyss-Coray *et al.*, 2003). Sin embargo, este efecto positivo se ve contrarrestado por el daño neuronal que causan, debido a la liberación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, y a la respuesta inflamatoria desencadenada por la liberación de citoquinas (Griffin *et al.*, 1998; Heneka *et al.*, 2001).

La regulación de la actividad de la GSK-3, como diana terapéutica, puede ser esperanzadora en el estudio de esta enfermedad, como demuestran los estudios recientes en modelos animales, en los que la actividad regulada y normal de la GSK-3 supuso una reversión a los niveles normales de la fosforilación de tau y un descenso de la muerte neuronal asociada al Alzheimer (Engel *et al.*, 2006).

#### **4. RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

La señalización purinérgica es crucial en el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Además, mecanismos que dependen de nucleótidos extracelulares y sus receptores P2 están también implicados en una serie de disfunciones del sistema nervioso central. Así, dichos receptores P2 juegan un papel importante en enfermedades como epilepsia, depresión, dolor neuropático, neoplasias del sistema nervioso como glioma y neuroblastoma y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer y esclerosis múltiple. Todas estas patologías están asociadas a cambios en la expresión de ectonucleotidasas extracelulares, receptores P2X y P2Y en neuronas y células gliales, así como en la liberación de grandes cantidades de nucleótidos desde células del tejido nervioso activadas o dañadas hacia el espacio extracelular, lo cual contribuye a alterar la señalización purinérgica. Existen numerosos estudios que apuntan a un potencial uso de agonistas/antagonistas de receptores P2 en el tratamiento de ciertas enfermedades del sistema nervioso. Esto es de vital importancia ya que

muchos de los fármacos empleados hasta ahora presentan una baja efectividad y provocan efectos secundarios perjudiciales.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la enfermedad de Alzheimer está relacionada con la muerte progresiva de neuronas y con la pérdida de conexiones sinápticas en áreas de corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales, debido al acúmulo de depósitos patológicos, principalmente de péptido  $\beta$ -amiloide, que forma placas seniles, y de proteína tau hiperfosforilada, que forma ovillos neurofibrilares. Entre las causas de esta formación de placas seniles varios investigadores apuntan a un descenso en la eliminación microglial del A $\beta$  (Kim HJ *et al.*, 2012) y en una activación crónica de dichas células (Kitazawa *et al.*, 2004). El péptido  $\beta$ -amiloide induce la generación de radicales libres e inflamación, llevando finalmente a la muerte de las neuronas y al desarrollo de demencia. Por otra parte, como también se ha mencionado, la actividad de la  $\alpha$ -secretasa conduce a la formación de sAPP $\alpha$  soluble, que se caracteriza por sus propiedades neuroprotectoras y neurotróficas.

Se han realizado varios estudios para identificar el papel de la señalización purinérgica en el desarrollo de AD, pero lo que sigue siendo crucial es el hecho de que las neuronas dañadas a lo largo del desarrollo de la enfermedad liberan cantidades considerables de nucleótidos, los cuales participan tanto en el avance de la patología como en mecanismos de neuroprotección. El ATP liberado puede actuar como una señal para células microgliales (Inoue *et al.*, 2007), mientras que tanto este nucleótido como el UTP inducen la migración de astrocitos (Wang *et al.*, 2005). Estas células se acumulan alrededor de los depósitos de A $\beta$  en el cerebro (Apolloni *et al.*, 2009; Peterson *et al.*, 2010). Los astrocitos, que fueron activados y se acumularon alrededor de estas placas probablemente son responsables de la homeostasis del A $\beta$  y de la modulación del entorno neuronal (Franke *et al.*, 2012). El péptido  $\beta$ -amiloide es uno de los factores que induce la liberación de ATP por parte de los astrocitos (Peterson *et al.*, 2010) y de la microglia (Kim HJ *et al.*, 2012). Los nucleótidos extracelulares toman parte en el proceso de inflamación, induciendo quimiotaxis microglial (Domercq *et al.*, 2013), proliferación, liberación de citoquinas, adhesión (Ohsawa *et al.*, 2010) y astrogliosis (Abbracchio *et al.*, 2006) en respuesta a agentes dañinos. La

astrogliosis ha sido descrita como una característica de la enfermedad de Alzheimer (Franke *et al.*, 2011). La acumulación de citoquinas proinflamatorias, así como de A $\beta$ , contribuye a la progresión de la patología (Weisman *et al.*, 2012).

La inflamación es un elemento esencial de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo AD. En los estadios iniciales, constituye un mecanismo neuroprotector mediante la secreción de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas y la eliminación del A $\beta$  neurotóxico de los tejidos (Peterson *et al.*, 2010). Las células de la microglía son las encargadas de internalizar y degradar el A $\beta$  y también de producir factores quimiotácticos, como MCP-1 e IL-1 $\beta$  (Kim *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando el proceso inflamatorio se alarga en el tiempo se convierte en un mecanismo neurodegenerativo (Franke *et al.*, 2012). La inflamación crónica es el resultado de mantener activados los astrocitos y la microglia en respuesta al estrés oxidativo, que se ha postulado como un factor importante en los primeros estadios del AD. El estrés oxidativo también aumenta la producción de A $\beta$  (Peterson *et al.*, 2010). La activación de los receptores P2X7 microgliales por ATP o BzATP estimula una producción elevada de radicales anión superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ) que inducen la muerte de neuronas corticales (Parvathenani *et al.*, 2003). Según Kim y cols. (Kim *et al.*, 2007), en este caso en particular las células microgliales estimuladas por A $\beta$  constituyen la fuente de ATP. Estos investigadores confirmaron que este mecanismo está involucrado en la activación de una NADPH oxidasa y la inducción de estrés oxidativo.

Se ha descrito la presencia de varios mediadores de la inflamación en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo citoquinas, quimioquinas, proteasas e inhibidores de proteasas. La microglia participa en el desarrollo de AD liberando citoquinas proinflamatorias con actividad neurotóxica. La IL-1 $\beta$  (Kong *et al.*, 2009) es una de estas citoquinas y la microglia es su fuente principal (los astrocitos también la liberan, pero en mucha menor cantidad) (Sanz *et al.*, 2009). Es la responsable de regular la expresión de muchos mediadores proinflamatorios en el cerebro con AD (Weisman *et al.*, 2012), de aumentar la expresión y el procesamiento de la APP, así como de fosforilar la proteína tau, lo que puede contribuir al daño de las neuronas y la activación microglial (Kong *et al.*, 2009). Al igual que TNF- $\alpha$  y ATP, la IL-1 $\beta$  es liberada por la microglia tras su activación a

través de un receptor P2X7 (Weisman *et al.*, 2012; Monif *et al.*, 2009). En respuesta a la estimulación por A $\beta$ , la liberación de IL-1 $\beta$ , pero no de TNF- $\alpha$ , puede ser modulada por el ATP extracelular (Sanz *et al.*, 2009; Rampe *et al.*, 2004). Según Bernardino y cols. (2008) la liberación de IL-1 $\beta$  dependiente de P2X7 puede aumentar la susceptibilidad neuronal ante una subsecuente exposición a un agente excitotóxico, y es necesaria para la exacerbación de la pérdida neuronal. Se detectó un aumento en la expresión del receptor P2X7 en la microglia localizada alrededor de los depósitos amiloides, en un modelo de ratón de AD (Parvathenani *et al.*, 2003). Esta expresión también se encuentra aumentada en la microglia de humanos adultos con AD, así como en la microglia fetal humana tras ser expuesta a A $\beta$  (McLarnon *et al.*, 2006). Las propiedades del receptor P2X7 pueden ser empleadas en terapias nuevas, donde la administración de un antagonista puede prevenir los efectos adversos causados por una neuroinflamación crónica, así como por la actividad patológica en células gliales (Takenouchi *et al.*, 2010). Ryu y McLarnon (2008) observaron una actividad neuroprotectora y una inhibición de la respuesta inflamatoria tras la administración de uno de los antagonistas del receptor P2X7. La administración de BBG conllevó una expresión disminuida de este receptor en la superficie de las neuronas de rata, una gliosis atenuada y una menor filtración en la barrera hematoencefálica, lo cual había sido inducido por una administración previa de A $\beta$ .

El péptido  $\beta$ -amiloide también induce disfunción y muerte neuronal mediante la alteración de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>. Se cree que este péptido provoca un aumento del flujo de Ca<sup>2+</sup> a través de los receptores NMDA (receptores de N-metil-D-aspartato) y los canales VOCC (canales de Ca<sup>2+</sup> operados por voltaje), sin embargo, el uso de sus antagonistas/moduladores ha demostrado una eficacia limitada en ensayos clínicos para el tratamiento de AD. Según Varma y cols. (2009), el péptido  $\beta$ -amiloide aumenta el acúmulo de los receptores permeables a Ca<sup>2+</sup> P2X4 en la superficie de las neuronas y también induce su procesamiento proteolítico mediado por caspasa-3. Todo ello lleva a un retraso en los tiempos de cierre de estos canales e impiden la internalización inducida por agonista de los receptores, lo cual provoca un aumento en el flujo de Ca<sup>2+</sup>.

Kong y cols. (Kong *et al.*, 2009) observaron un aumento en la expresión y la actividad del receptor P2Y<sub>2</sub> en neuronas corticales de rata bajo la influencia de IL-1 $\beta$ . En condiciones fisiológicas, el receptor P2Y<sub>2</sub> muestra un bajo nivel de expresión y no hay respuesta a UTP (Peterson *et al.*, 2010). Sin embargo, en este caso, el UTP activó el receptor, dando lugar a la liberación de sAPP $\alpha$  a través de un mecanismo dependiente de la actividad de ADAM10/17 y PI3K, mientras que la actividad de ERK1/2 y PKC pueden regular de manera indirecta el procesamiento de la APP (Kong *et al.*, 2009). Los receptores neuronales P2Y<sub>2</sub> también participan en la fosforilación de una proteína del citoesqueleto, la cofilina, que lleva finalmente a estabilizar el crecimiento de neuritas y de espinas dendríticas. Este es otro mecanismo neuroprotector más, en el que participa este receptor, en el curso de la enfermedad de Alzheimer (Franke *et al.*, 2011).

El aumento de la expresión de receptores P2Y<sub>2</sub> por efecto del A $\beta$  (muy probablemente con la participación de IL-1 $\beta$ ) también fue detectado en microglia de ratón, la cual mostró una mayor movilidad y capacidad de captar y degradar este péptido en respuesta a ATP o UTP (Kim *et al.*, 2012). Esto está de acuerdo con otros estudios realizados en modelos de ratón, donde los receptores P2Y<sub>2</sub> son cruciales para un correcto reclutamiento y actividad de la microglía, así como para la eliminación de A $\beta$  mediada por estas células. Una expresión reducida de estos receptores se vio asociada a tiempos de supervivencia menores y un desarrollo más rápido de déficits neurológicos (Ajit *et al.*, 2014). La evaluación post-mortem de muestras de pacientes con AD reveló una expresión disminuida de receptores P2Y<sub>2</sub> en las zonas del cerebro normalmente afectadas en esta enfermedad, al compararlas con muestras de controles sanos, mientras que la expresión de los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> permanece sin cambios (Lai *et al.*, 2008). Esto indica que los receptores P2Y<sub>2</sub> pueden formar parte de mecanismos de neuroprotección y que constituyen una posible diana terapéutica que puede prevenir la muerte neuronal en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

En conclusión, el péptido  $\beta$ -amiloide presente en la enfermedad de Alzheimer, así como el estrés crónico y las lesiones neuronales, liberan grandes cantidades de nucleótidos. Esto conduce a una respuesta inflamatoria en células gliales y a la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y la liberación



de más nucleótidos lo cual puede causar lo siguiente: (1) progreso de la enfermedad al inducir estrés oxidativo y aumentar la acumulación de depósitos de  $\beta$ -amiloide y proteína tau; (2) actividad neuroprotectora al aumentar, mediante la acción de IL-1 $\beta$ , la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> neuronal, cuya activación resulta en la producción de sAPP $\alpha$  soluble y en una reorganización del citoesqueleto neuronal; el receptor P2Y<sub>2</sub> también es responsable de movilizar la microglia hacia los depósitos de  $\beta$ -amiloide para su eliminación. El ATP es probablemente el mediador inflamatorio crucial en el curso de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el papel completo del ATP como factor que induce mecanismos tanto neurodegenerativos como neuroprotectores aún requiere más explicación.

#### **4.1 Receptores de nucleótidos en el procesamiento de la APP.**

Como ya se ha mencionado, la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> incrementa la liberación de sAPP $\alpha$  en cultivos primarios de neuronas corticales de rata tratadas con IL-1 $\beta$  (Kong *et al.*, 2009). La línea celular de astrocitoma humano 1321N1 también presenta liberación de sAPP $\alpha$  dependiente de ADAM10 y ADAM17/TACE tras la activación de receptores P2Y<sub>2</sub> con UTP (Camden *et al.*, 2005). Este proceso de activación de  $\alpha$ -secretasa y de liberación de sAPP $\alpha$  dependiente de P2Y<sub>2</sub> previene la formación de péptido  $\beta$ -amiloide de la misma molécula de APP (el procesamiento por  $\alpha$ -secretasa hace imposible la formación de A $\beta$ ) (Peterson *et al.*, 2010). Delarasse y cols. (2011) afirmaron que, además del receptor P2Y<sub>2</sub>, también el receptor P2X7 induce la formación y liberación de sAPP $\alpha$  (en células de neuroblastoma humano y de ratón, así como en células primarias de astrocito y células progenitoras neurales de ratón). Este proceso depende de la fosforilación de ERK1/2 y JNK, lo que lleva a una activación de una vía diferente para la liberación de sAPP $\alpha$ . Según Tran, los astrocitos corticales de rata son la fuente de APP y tanto su producción como su liberación pueden ser reguladas por la activación de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> acoplados a la vía de las MAPK (Tran, 2011).

## **5. RATONES J20 COMO MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Existen varios modelos de ratones transgénicos y knockout para la APP. De entre ellos, los ratones J20 descritos por Hsia y cols. (1999) presentan una elevada sobreexpresión de A $\beta$ 42 debido a la introducción de la APP humana (hAPP) con dos mutaciones ligadas a la enfermedad de Alzheimer familiar, las mutaciones Sueca (K670N y M671L) e Indiana (V717F). La expresión del transgen está bajo el control del promotor específico neuronal PDGF- $\beta$ , con un fondo genético C57/B16XBA2J. En estos ratones hAPP J20, entre los 5 y los 7 meses de edad aparecen unos depósitos difusos tipo amiloide en el giro dentado del hipocampo y capas más profundas del neocortex, y unas placas neuríticas más grandes al superar la edad adulta. Este modelo acelerado de formación de depósitos de A $\beta$  ha demostrado ser muy robusto con más del 90% de los ratones J20 presentando depósitos amiloidogénicos inmunoreactivos a los 7 meses de edad (Mucke *et al.*, 2000). Además, los ratones J20 muestran una disminución significativa en el marcador de terminales nerviosas presinápticas, sinaptofisina, en el giro dentado. Este hallazgo supone un marcador histológico muy útil para la funcionalidad sináptica, la cual se ve deteriorada, al igual que algunas capacidades cognitivas, en los ratones transgénicos hAPP incluso antes de que aparezcan depósitos de amiloide.

Varios estudios muestran que los ratones hAPP J20 de entre 6-7 meses de edad presentan un déficit en la adquisición y retención de la memoria espacial, como se pone de manifiesto en la prueba de localización de plataforma oculta ("water maze") (Palop *et al.*, 2003). Los niveles disminuidos de las proteínas dependientes de calcio c-fos y calbindina D28k en el giro dentado del hipocampo, sugieren un papel de la homeostasis del calcio en la patología de los ratones J20, que también puede ser un mecanismo de neurodegeneración que da lugar a la disfunción cognitiva en AD.



# Objetivos



Como se ha comentado en la sección previa, los receptores de nucleótidos (receptores P2) se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos neurales, en los que participan en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. De ellos destaca el receptor P2X7, que es expresado abundantemente en neuronas, donde parece estar dirigido a las terminales nerviosas, así como en células de la microglía. Los receptores P2X7 se han descrito como agentes involucrados en diversos procesos neurodegenerativos. En este sentido, es conocido que la expresión de este subtipo de receptor se ve incrementada en el cerebro de los pacientes afectados de la enfermedad de Alzheimer. También se observa un incremento de la expresión de dicho receptor en modelos de ratones transgénicos utilizados en el estudio de esta enfermedad. La administración de antagonistas del receptor P2X7 tiene un efecto neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer, efecto que se ha relacionado con una reducción en la respuesta inflamatoria asociada con esta patología. Sin embargo, poco es lo que se sabe sobre el posible papel del receptor P2X7 en el procesamiento proteolítico de la proteína APP, pese a que es conocido que la activación del receptor P2X7 conduce a cambios en la actividad de enzimas, como GSK-3, que, a su vez, modulan la formación del péptido  $\beta$ -amiloide,

La principal hipótesis en la que se basa esta Tesis Doctoral es que el receptor P2X7 pudiera actuar modulando el procesamiento de la proteína APP, siendo los efectos beneficiosos que se observan tras la administración de antagonistas de este receptor en modelos animales de AD, debidos, al menos en parte, a su acción sobre la generación del péptido A $\beta$ .

Para verificar esta hipótesis se llevaron a cabo ensayos *in vitro* del efecto de la activación o inhibición del receptor P2X7 sobre el procesamiento de la APP dependiente de secretasas. En una etapa posterior, se utilizaron ligandos de este receptor en ensayos *in vivo* de la generación de depósitos amiloides en los ratones J20 modelo de Alzheimer.

Los objetivos específicos han sido:

1. Estudio del efecto de la estimulación con agonistas del receptor P2X7 en el procesamiento de la APP en células N2a, mediante la medida de los fragmentos carboxilo terminales generados por la acción de las secretasas.
2. Estudio del efecto del bloqueo farmacológico del receptor P2X7 en el procesamiento de la APP en células N2a y análisis del papel de GSK-3 en dicho efecto.
3. Estudio *in vivo* del efecto de la inhibición del receptor P2X7 en el procesamiento de la proteína APP y la generación de las placas de amiloide en los ratones J20.

# **Materiales y Métodos**





## 1. MATERIALES

### 1.1. Instrumentación (ver Tabla 5).

**Tabla 5.** Relación de los diferentes aparatos utilizados

Categoría y uso	Instrumentación	Modelo
Instrumentación general	Granatario AND	Fx 2000
	Balanza de precisión AND	ER-60
	Agitadores magnéticos	S
	Agitadores orbitales	Luckham 802
	pHmetros	Crison 2001
	Pipetas automáticas	Eppendorf y Gilson
	Sistemas de purificación de agua	Milli-Ro/Milli-Q (Millipore)
	Microfuga Eppendorf	5414D
	Centrífugas Eppendorf	5702 R y 5804 R
	Centrífuga refrigerada	Sorvall RC5C
	Baños termostatizados	Tectron 3473100
	Calentadores multibloque	Thermomixer compact de Eppendorf
Cultivos celulares	Campana de flujo laminar horizontal	Tel-Star, AH-100
	Autoclave alta capacidad	Steam Sterilizer, Trade Raypa
	Autoclave baja capacidad	Certoclav
	Placas de Petri estériles	Falcon
	Cubreobjetos de vidrio	Deckgläser
	Pipetas de aspiración	Pipet-Aid XP (Drummond)
	Pipetas estériles	Costar
	Incubador	Shel-Lab
	Filtros de 0,22 $\mu$ M	Millex-GS (Millipore)
	Jeringas estériles	Falcon
	Cámara de Neubauer	Nessler
	Microscopio óptico	Nikon

<b>Expresión génica</b>	Equipo de extracción de ARN	ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prepstation (Applied Biosystems)
	Lector de placas	FLUOstar OPTIMA
	Espectrofotómetro	Eppendorf Biophotometer
	Termociclador	GeneAmp2400 (Applied Biosystems)
	Sistema de visualización de geles	Gel Logic 200 Imaging System (Kodak)
<b>Microfluorimetría</b>	<b>Microscopio</b>	Nikon Eclipse TE-2000-E
	Cámara	ORCA-ER 42-98 CCD (Hamamatsu)
	Objetivo	Nikon S Fluor 40x 0,5-1,3
	Monocromador con apertura de 10 nm	Optoscan monocromator, Cairn
	Software controlador	Metafluor 6.3r & PC software (Universal Imaging Copr).
<b>Técnicas inmunológicas</b>  <i>Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia</i>         <i>Inmunotransferencia</i>	<b>Criostato</b>	Leica
	Microscopio de fluorescencia	NIKON TE-2000-E
	Lámpara de Xenon	Nikon
	Cámara	Kappa DX2
	Software controlador	Kappa Image Base Control
	Sistema de electroforesis	Mini-Protean 3 (Bio-Rad)
	Sistema de transferencia	Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell
	Máquina de revelado	AGFA CP-1000
	Equipo de densitometrado	Gel Logic 200 Imagin System (Kodak)

## 1.2. Reactivos.

Todos los medios y soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En la Tabla 6 se detallan los compuestos y reactivos utilizados en cada uno de los ensayos realizados, así como las casas comerciales que los suministraron. En general, cualquier sustancia no especificada en las tablas fue proporcionada por Sigma-Aldrich o Merck.

**Tabla 6. Relación de compuestos y reactivos utilizados**

Categoría y uso	Reactivo	Casa comercial
<b>Cultivos de neuronas</b>	Neurobasal, B27, solución de antibióticos/antimicóticos Glutamina, AraC Papain Dissociation System Poly-L-lisina (0,1 mg/ml) Azul tripán, Poly-L-lisina (1 mg/ml)	Gibco Sigma-Aldrich Whorthington Biochrom AG Sigma-Aldrich
<b>Experimentos de PCR</b>		
<i>Extracción y limpieza de ARN</i>	RNeasy Mini Kit Kit DNA free	Quiagen Ambion
<i>Geles</i>	Agarosa D1, Agarosa M8 SYBR-Safe DNA stain	Pronadisa Molecular Probes
<i>RT</i>	TaqMan <sup>®</sup> RT reagents. M-MLV RT reagents	Applied Biosystems, Invitrogen
<i>PCR</i>	AmpliTaqGold PCR Master Mix	Applied Biosystems
<i>Q-PCR</i>	TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix Fast No Ampearse, TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays	Applied Biosystems
<i>Inhibidores de ARNasas</i>	DEPC, RNase-Zap	Fluka Chemie Sigma-Aldrich
<b>Transfecciones</b>	Lipofectamina 2000	Invitrogen

<b>Microfluorimetría</b> <i>Sonda fluorescente de <math>\text{Ca}^{2+}</math></i>	Fura-2 AM	Molecular Probes
<b>Farmacología</b> <i>Agonistas y antagonistas purinérgicos</i>	ATP, BzATP, UDP, Up <sub>4</sub> U, UTP, BBG, A438079	Sigma-Aldrich, Tocris
<i>Otros</i>	TAPI-1, GM6001, inhibidor de BACE1 tipo IV, SB216763	Calbiochem, Sigma-Aldrich
<b>Inmunohistoquímica</b> <i>Fijación y bloqueo</i>	<i>p</i> -formaldehído, suero de cabra, Tritón X-100, BSA	Sigma-Aldrich, Molecular Probes
<i>Colorantes</i>	Sudan Black Tioflavina-T	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
<i>Anticuerpos primarios</i>	anti-P2X7R (intracelular de conejo) anti-A $\beta$ , clon WO2 (ratón) anti-Iba-1 (conejo) anti-GFAP (conejo)	Alomone The Genetics Company Wako Santa Cruz
<i>Anticuerpos secundarios</i>	anti-inmunoglobulinas de conejo y ratón biotiniladas (cabra)	Wako
<i>Revelado</i>	Streptavidina-HRP, Diaminobencidina	Sigma-Aldrich
<b>Inmunofluorescencia</b> <i>Fijación y bloqueo</i>	<i>p</i> -formaldehído, suero de cabra, Tritón X-100 y BSA	Sigma-Aldrich, Molecular Probes
<i>Anticuerpos primarios</i>	anti-GFAP (conejo). anti-P2X7 (conejo) anti-P2Y <sub>2</sub> (conejo) anti-NeuN (ratón) anti-Iba-1 (conejo) anti-GSK3 $\alpha/\beta$ anti-fosfo-GSK3 anti-APP N-terminal (clon 22C11) anti-APP CTF anti-A $\beta$ (clon WO2 ratón)	Sigma-Aldrich Alomone, Chemicon Alomone Chemicon Wako Invitrogen Cell Signaling Chemicon Sigma-Aldrich The Genetics Company

<i>Anticuerpos secundarios</i>	anti- $\alpha$ -tubulina anti-IL-1 $\beta$ (rata) Alexa 488 anti-IgG de ratón (cabra) Alexa 488 anti-IgG de conejo (cabra) Alexa 594 anti-IgG de conejo (cabra) Alexa 647 anti-IgG de ratón (cabra) anti-IgG de conejo-Cy3 (burro)	Sigma-Aldrich R&D Systems Molecular Probes Molecular Probes Molecular Probes Jackson Jackson
<b>Inmunotransferencia</b>		
<b><i>Extracción y cuantificación de proteínas</i></b>	Hepes, EDTA, NaCl, NaF, Triton X-100, ortovanadato sódico, ácido okadaico, cOmplete® Mini EDTA-free (inhibidores de proteasas), RIPA	Sigma-Aldrich, Merck, Roche, Calbiochem
<b><i>Electroforesis y transferencia</i></b>	Reactivo Bradford Persulfato amónico, bis-acrilamida, SDS, TEMED, glicina, patrones de peso molecular conocido y $\beta$ -mercaptoetanol	BioRad BioRad
<b><i>Anticuerpos primarios</i></b>	Tris, azul de bromofenol y metanol Membranas de nitrocelulosa Rojo Ponceau anti-P2X7 (conejo). anti- $\alpha$ -tubulina (ratón). anti-APP (clon 22C11) anti-APP CTF (conejo) anti-A $\beta$ (clon WO-2) anti-fosfo-GSK-3 Ser 9/21 anti GSK3 $\alpha/\beta$ total	Merck Whatman Sigma-Aldrich Alomone, Chemicon Sigma-Aldrich Chemicon Sigma-Aldrich The Genetics Company Cell Signalling Invitrogen
<b><i>Anticuerpos secundarios</i></b>	anti-IL-1 $\beta$ (rata) anti-IgG de conejo-HRP (cabra) y anti-IgG de ratón-HRP (conejo)	R&D Systems DakoCytomation
<b><i>Revelado de membranas</i></b>	Reactivo ECL Películas de autorradiografía	PerkinElmer Agfa
<b>Ensayos de viabilidad</b>	MTT (sal tetrasódica)	Sigma-Aldrich

### 1.3. Modelos de estudio

#### 1.3.1 Cultivos celulares.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos líneas celulares: el neuroblastoma de ratón Neuro-2a (N2a) y la línea derivada de células de riñón embrionario humano HEK293t. Ambas líneas celulares fueron sembradas a una densidad de  $8,4 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente, y cultivadas en medio DMEM (una modificación del medio Basal Medium Eagle BME) suplementado con Glutamax (Invitrogen), penicilina/streptomycin (Invitrogen) y suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS, Euroclone, Milan, Italia). Las células se mantuvieron a 37°C en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 5%.

#### 1.3.2 Animales.

Los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las normativas europea y española (Directiva 2010/63/UE; Ley 32/2007, RD 1201/2005 y RD 53/2013) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio y siguiendo las pautas indicadas por el Consejo Internacional para la Ciencia del Animal de Laboratorio (ICLAS).

Los animales permanecieron estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, con comida y agua *ad libitum*, temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

**Ratones C57BL/6J.** Los ratones de esta cepa se utilizaron como control en todos los experimentos realizados en este estudio.

**Ratones hAPP J20.** Los ratones de esta cepa, descritos previamente (Mucke *et al.*, 2000), fueron facilitados por Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, USA). Como se ha indicado anteriormente, estos ratones transgénicos expresan una forma mutada de la Proteína Precursora de Amiloide humana que presenta tanto la mutación Sueca (K670N/M671L) como la Indiana (V717F) (APPSwInd). Estos ratones se originaron inyectando una construcción transgénica que contenía el APPSwInd bajo el control del promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas humano (PDGFB), homólogo del oncogén v-sis (virus del sarcoma del simio), en embriones unicelulares de ratones C57BL/6 X DBA/2 F2. Animales

heterocigotos fueron cruzados con ratones C57BL/6 X DBA/2 F1 y los ratones transgénicos resultantes fueron retrocruzados durante 12 generaciones con C57BL/6J.

Esta cepa, denominada B6.Cg-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)20Lms/2J o línea "J20", muestra un incremento, dependiente de la edad, de los niveles del péptido A $\beta$  en el hipocampo, desarrollando los característicos depósitos amiloides hacia los 6-8 meses de edad, y constituye un modelo de utilidad en estudios de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) y sus posibles tratamientos terapéuticos.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Estudios de expresión génica.**

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante cuantificación relativa de los transcritos expresados realizando análisis de RT-PCR en tiempo real. La manipulación de ARN en todo momento tuvo lugar en condiciones libres de ARNasas.

#### **2.1.1. Obtención de muestras.**

El material genético necesario para los ensayos de expresión del ARN mensajero, específico de los genes de estudio, se obtuvo a partir de diferentes muestras biológicas, según el experimento en curso.

En una primera parte se determinaron los niveles de expresión de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> de ratón en cultivos de células de neuroblastoma N2a.

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio de la expresión del receptor P2X<sub>7</sub>, la proteína APP humana mutada y la APP endógena de ratón, en distintas regiones cerebrales de los ratones J20 empleados.

**Muestras de ARN de cultivos celulares.** La extracción de ARN total a partir de células de neuroblastoma N2a, se realizó siguiendo el protocolo descrito para el kit comercial "RNeasy mini Kit" (Quiagen) cuyo fundamento está basado en la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de unirse de forma específica a



una columna de sílica gel cuando está en presencia de una elevada concentración de sal.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $8 \times 10^5$  células/pocillo y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. En el momento de la extracción del ARN, se aspiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron una vez con PBS estéril. Se añadieron 600  $\mu$ L del tampón de lisis especificado en el protocolo (RLT Plus conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol) sobre las células, que se levantaron de las placas de cultivo mediante el uso de raspadores celulares estériles. De esta forma se libera el contenido celular a la vez que se consigue una inactivación rápida de las ARNasas evitando así la degradación del ARN en el lisado celular. Una vez se completó el proceso de homogenización, las muestras se lavaron con etanol 70% y se procedió a la purificación del ARN siguiendo las pautas descritas por el fabricante en el protocolo de extracción.

**Muestras de ARN de tejido.** La extracción de ARN total a partir de tejido de hipocampo de los ratones se realizó mediante el sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos: ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid Prepstation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), usando el protocolo propio del sistema, específico para aislar ARN a partir de muestras de tejido. La homogenización inicial de las muestras comenzó con la disgregación mecánica con tijeras y después jeringas, ambas estériles, en presencia del tampón de lisis indicado en el protocolo, y la incubación del homogenado en presencia de proteinasa K (Sigma) durante 1-2 horas. A partir de aquí se siguieron los pasos indicados en el protocolo de extracción.

**Tratamiento con ADNasa.** Una vez finalizada la extracción del ARN total, se procedió a la incubación de las muestras en presencia de ADNasa I libre de ARNasas (DNA-free™, Ambion), durante 45 minutos a 37°C, con el fin de eliminar la posible contaminación de las mismas con ADN. Finalizado el tiempo de incubación se inactivó la ADNasa remanente y se recuperó la fracción de ARN altamente purificada.

### **2.1.2. Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído.**

La concentración de ARN en las muestras extraídas se determinó mediante un método fluorimétrico de gran sensibilidad utilizando el reactivo RiboGreen (RNA Quantitation Reagent, Molecular Probes). El RiboGreen unido al ARN en solución presenta un máximo de excitación a 500 nm y de emisión a 525 nm, pudiendo detectar concentraciones de ARN próximas a 1 ng/mL.

Las concentraciones de ARN de las muestras problema se estimaron interpolando los valores de emisión de fluorescencia obtenidos en el ensayo a partir de una recta estándar, que se construyó representando concentraciones de ARN conocidas frente a sus correspondientes datos de emisión de fluorescencia.

El grado de pureza del material extraído se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual, para una disolución de ARN puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

### **2.1.3. Reacción de la transcriptasa inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando la transcriptasa inversa M-MLV, 6 µg de cebadores de secuencia aleatoria y 350 µM de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Invitrogén), a partir de 1 µg de ARN total extraído de la muestra correspondiente. La reacción se desarrolló durante 90 minutos a 37° C, seguida de una incubación a 70°C durante 15 minutos con el fin de inactivar la transcriptasa inversa.

Los fragmentos correspondientes en cada caso se amplificaron por PCR a tiempo final a partir del ADNc resultante de la reacción anterior. Para ello se tomaron 5 µL del producto de la retrotranscripción en un volumen final de reacción de 25 µL que contenía AmpliTaqGold polimerasa (en forma de mezcla de reacción comercial que contiene los dNTPs, el tampón de reacción y la polimerasa) y oligonucleótidos específicos, ambos de Applied Biosystems.

En todos los casos, la reacción de amplificación se inició incubando la mezcla a 94°C durante 5 minutos para la activación de la AmpliTaq Gold DNA

polimerasa, y a continuación se repitieron 40 ciclos en las condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación (94° C, 30 segundos; 60° C, 30 segundos; 72° C, 30 segundos). Una vez completado el número total de ciclos, se realizó un paso de extensión final manteniendo la mezcla durante 7 minutos a 72°C para facilitar la completa elongación de todos los fragmentos amplificados durante la reacción de PCR.

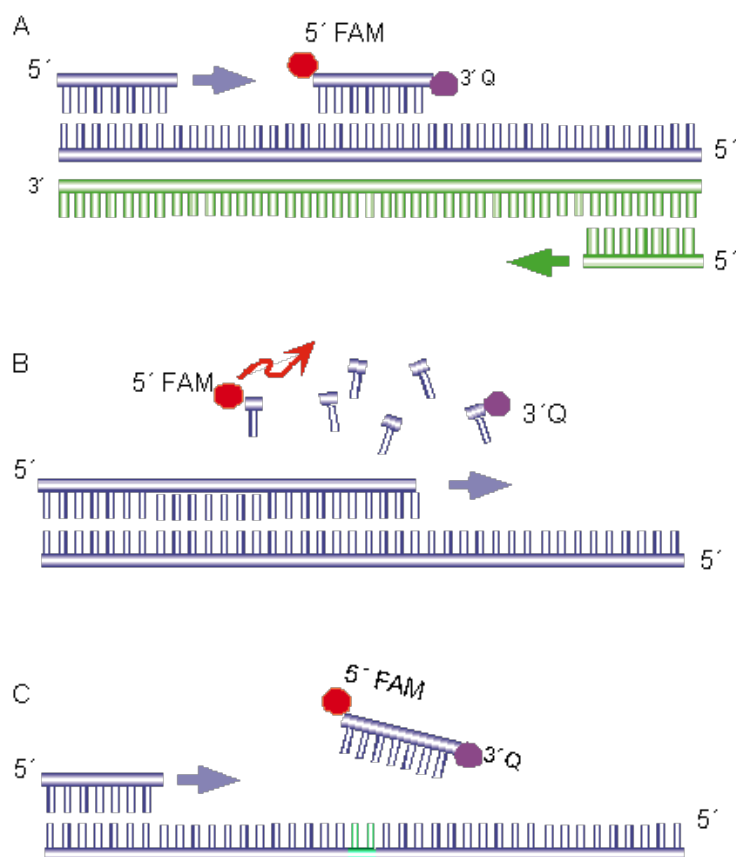
Las reacciones de retrotranscripción y amplificación por PCR a tiempo final se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems. La separación e identificación de los productos resultantes de la amplificación se realizó en geles de agarosa al 1,5-2%, teñidos con el marcador de ADN SYBR Safe (Molecular Probes). Como marcador de tamaños moleculares conocidos se utilizó el patrón de ADN comercial PCR 100 bp Low ladder (Sigma). Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imagin System (Kodak) con exposición a luz ultravioleta.

### **2.1.4. Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real).**

Este método permite detectar la amplificación de un producto de PCR durante cada ciclo de la reacción. El uso de esta técnica para cuantificar el material genético de una muestra está basado en la relación directa que existe entre la cantidad de ADN molde inicial y el producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma a mayor cantidad de ADN molde, menor será el número de ciclos de amplificación necesarios para la aparición del producto.

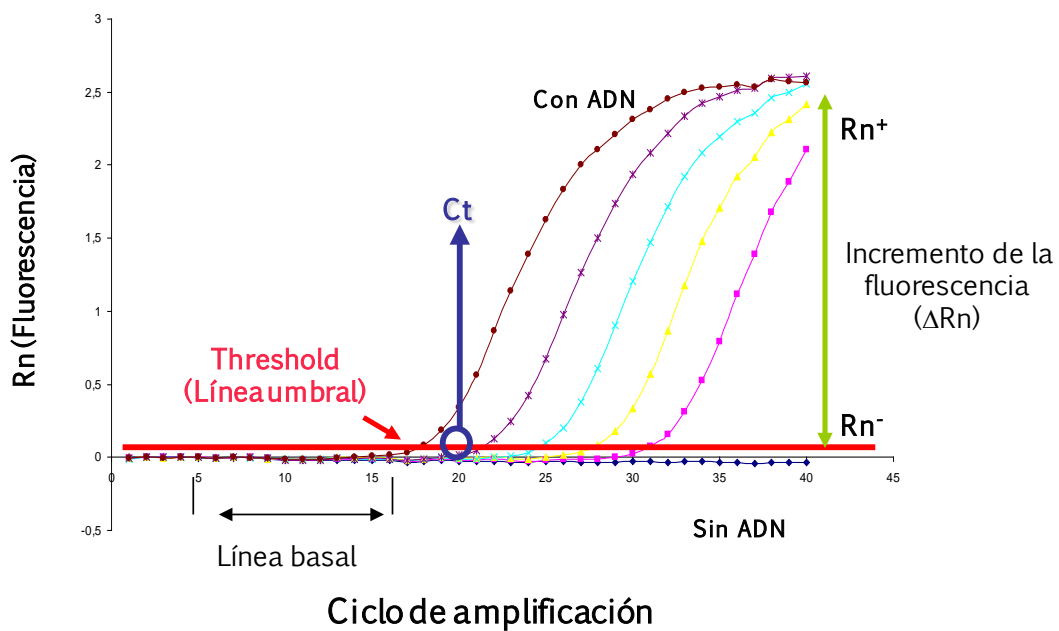
El seguimiento del proceso de amplificación se realiza mediante el uso de sistemas de marcado fluorescente que permiten detectar los productos que se van sintetizando durante el transcurso de la reacción. Así, la cantidad de fluorescencia emitida por el producto en cuestión incrementa en cada ciclo de amplificación. La reacción se lleva a cabo en termocicladores diseñados con un sistema capaz de monitorizar y cuantificar la señal de fluorescencia emitida.

Existen diversos sistemas de marcaje fluorescente que permiten la detección y cuantificación en las reacciones de PCR a tiempo real. Uno de los más utilizados es el sistema con sondas de hibridación TaqMan®.



**Figura 8.- Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.** La sonda hibrida de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo reportero que requiere una luz de excitación de alta energía y en el extremo 3' con otro fluoróforo diferente (apagador o “*quencher*”), que requiere una luz de excitación de baja energía y que absorbe la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Por tanto, cuando la sonda está intacta no emite señal fluorescente. Al inicio de la reacción de PCR, los dos oligonucleótidos y la sonda hibridan en la región diana del ADN molde y la Taq DNA polimerasa comienza el proceso de amplificación. Durante el proceso de extensión de la cadena que se está sintetizando, la ADN polimerasa termoestable, por su actividad 5'-3' exonucleasa, hidroliza la sonda en su extremo 5'. De esta forma el fluoróforo reportero se libera, la fluorescencia que emite no es absorbida por el *quencher* y su emisión puede ser detectada por el sistema. Los fragmentos de sonda son entonces desplazados del molde y la polimerización de la nueva cadena continúa. La extensión de la sonda durante el proceso de síntesis se evita al estar su extremo 3' bloqueado. El proceso de hibridación e hidrólisis de la sonda ocurre en cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

A medida que los ciclos de la reacción avanzan, aumenta el número de copias de producto generado, por lo que la intensidad de la fluorescencia emitida aumentará también de forma proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado. El termociclador detecta el incremento de fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) y lo representa frente al número de ciclos de la PCR (Figura 9). Durante los primeros ciclos de amplificación no hay incremento de fluorescencia, ya que es necesario que se acumule una cantidad mínima de producto amplificado para que la fluorescencia detectada por el sistema sea significativamente distinta del valor de fluorescencia basal. El ciclo de PCR en el que se acumula suficiente producto amplificado como para que el valor de fluorescencia se eleve por encima de la fluorescencia basal, se define como ciclo umbral o  $C_t$  (Cycle threshold). El valor del  $C_t$  es proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de ADN molde.



**Figura 9. Modelo de las curvas obtenidas en una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.** La línea roja indica la línea basal o *threshold*. En azul se muestra el punto considerado como el valor de  $C_t$ . Este valor coincide con el número de ciclos de amplificación en la reacción de PCR necesarios para iniciarse el incremento exponencial de fluorescencia ( $R_n$ ).

Los ensayos de cuantificación de la expresión génica se llevaron a cabo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de las muestras de ADNc obtenidas por retrotranscripción a partir de los mensajeros correspondientes. Los ADN complementarios se obtuvieron mediante el ensayo de transcriptasa inversa descrito en el apartado anterior.

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa se realizaron usando el sistema StepOne Plus Real Time PCR de Applied Biosystems utilizando el kit de amplificación TaqMan® Universal PCR Maxter Mix No AmpErase UNG del mismo fabricante. Se utilizaron sondas fluorescentes TaqMan marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y con el *quencher* NFQ-MGB en el extremo 3'. Los oligonucleótidos y sondas específicos para cada transcrito fueron diseñados, sintetizados y comercializados por Applied Biosystems.

El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 25 µL, conteniendo 1,25 µL de la mezcla de cebadores y sonda correspondiente, 2,5 µL de ARNt ([30 ng/mL]f), 3,75 µL de agua ultrapura estéril, 12,5 µL de la mezcla TaqMan® Universal PCR Master Mix (incluye los dNTPS, tampón de reacción y AmpliTaqGold® polimerasa) y 5 µL del ADNc obtenido tras las RT.

La reacción se desarrolló en un programa de 2 pasos:

- Incubación inicial a 95°C durante 20 segundos para la activación de la TaqGold® polimerasa.
- 40 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 1 segundo a 95°C e hibridación durante 20 segundos a 60 °C).

La cuantificación de los genes se realizó mediante el Método Comparativo de los Cts ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001) y la realización de una curva patrón. Como control interno de la cantidad total de ADNc añadida se utilizó el gen de expresión constitutiva  $\beta$ -actina.

## 2.2. Transfección transitoria en células de mamífero.

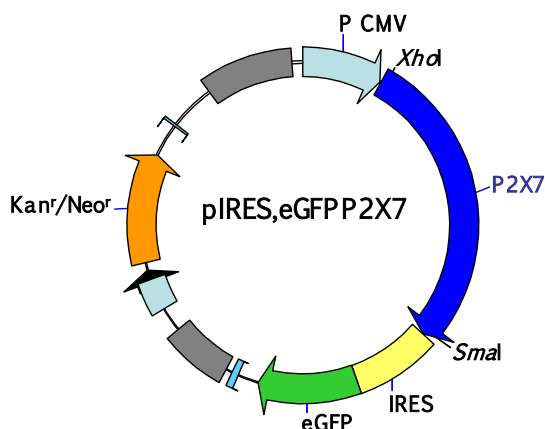
### 2.2.1. Plásmidos.

#### *Sobreexpresión del receptor P2X7.*

El ADNc que codifica para el receptor P2X7 humano se adquirió y secuenció en Geneservice (servicio de genómica) (número del clon de ADNc MGC: 20089, IMAGE: 4298811; Cambridge, UK). El ADNc del receptor P2X7 se aisló del plásmido original (pOTB7) por digestión con *KpnI* y *ApaI* y se subclonó en el vector pIRES.eGFP (BD Bioscience) (Figura 10) para así obtener la expresión tanto de P2X7 como de la proteína GFP. La expresión de la GFP permitió la identificación y el seguimiento de las células transfectadas. El producto de la ligación se confirmó mediante secuenciación con los siguientes primers:

5' PCR primer: CTAGGGTACCATGCCGGCCTGCTGCAGCTG.

3' PCR primer: CTAGGGGCCCGGTAAGGACTCTTGAAGCCAC.



**Figura 10.** Mapa del plásmido pIRES,eGFP.

#### *Sobreexpresión de GSK3- $\beta$ .*

Los plásmidos para la sobreexpresión de GSK-3 $\beta$  (pcDNA3-GSK-3) y la forma constitutivamente activa GSK-3 $\beta$ -S9A (pcDNA3-GSK3S9A) fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. JJ Lucas (CBM Severo Ochoa, Madrid).

**Generación del “small hairpin RNA” (shRNA) para el receptor P2X7.**

El silenciamiento del receptor P2X7 se realizó mediante la expresión de los correspondientes shRNA (“small hairpin RNA”). Para ello se utilizó el vector de expresión pSuper-neo/gfp (Oligoengine, Seattle, WA, EEUU), que, al expresar en paralelo el shRNA y la proteína verde fluorescente (GFP), permitió la identificación y el seguimiento de las células transfectadas.

Para el diseño de los shRNA se siguieron los criterios de diseño racional descritos por Reynolds *et al.* (2004) (Figura 11). La especificidad de las secuencias seleccionadas se confirmó mediante BLAST frente al receptor P2X7 de ratón, rata y humano.

**Criterios de selección de ARNi (Reynolds y cols., 2004).**

1. Contenido en GC 30%-52%.
2. Al menos 3 A/U en posición 15-19 (sentido).
3. Ausencia de repeticiones internas.
4. A en posición 19 (sentido).
5. A en posición 3 (sentido).
6. U en posición 10 (sentido).
7. Ninguna G/C en posición 19 (sentido).
8. Ninguna G en posición 13 (sentido).

Oligonucleótido seleccionado como siARN contra el receptor P2X7:

5'-GTTTTGACATCCTGGTTTT-3'

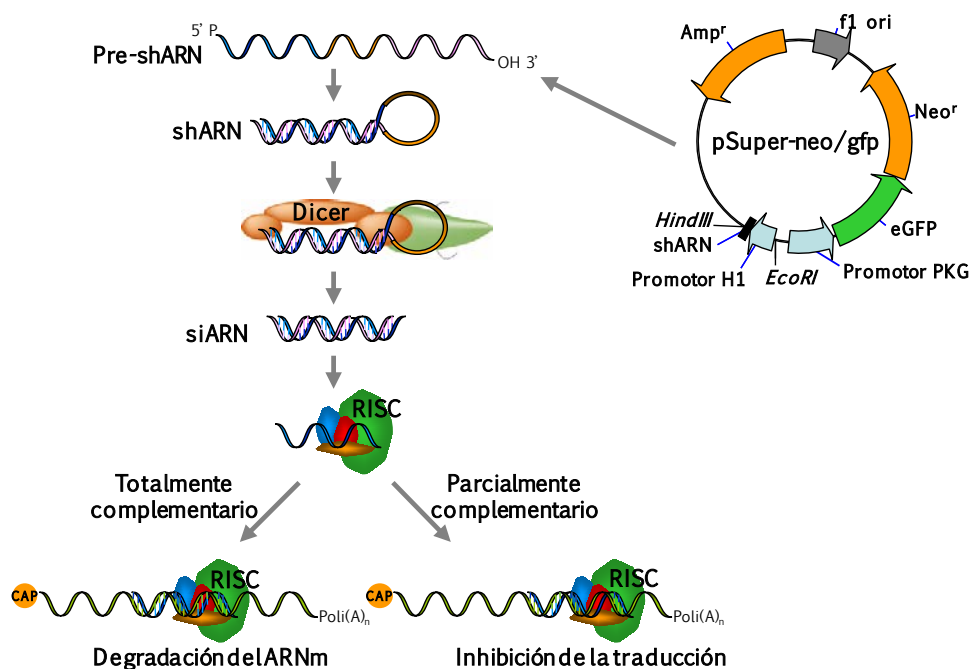
**Figura 11. Criterios de selección de ARNi y oligonucleótido seleccionado.**

A partir de las secuencias seleccionadas, se diseñaron unos oligonucleótidos de 64 bp (Isogen, Barcelona, España), de forma que, al ser expresados en la célula a partir del vector, se genera una estructura en horquilla (shRNA) con las secuencias sentido y antisentido de la región seleccionada (Figura 12). Esta estructura es reconocida por la enzima Dicer, que rompe la horquilla y produce los ARN de interferencia (ARNi) funcionales, que se unen a la secuencia correspondiente del ARN mensajero y conduce a su degradación por el complejo RISC (Figura 12). Si la especificidad de la secuencia de ARNi no es completa -presenta alguna base desapareada-, el mecanismo de acción consiste en prevenir la traducción debido a la presencia de fragmentos del mensajero que



tienen doble cadena, lo cual paraliza la acción de los ribosomas y la síntesis de la proteína a partir de dicho mensajero, sin degradar el ARNm.

Como control de las células transfectadas, se utilizó una secuencia contra el ADNc de la luciferasa de luciérnaga (5'-ctg acg cgg aat act tcg a-3'), no presente en el genoma de células de mamífero (Ohtsuka et al., 2004).



**Figura 12.** Mapa del plásmido pSuper-neo/GFP y mecanismo de acción de los ARN de interferencia.

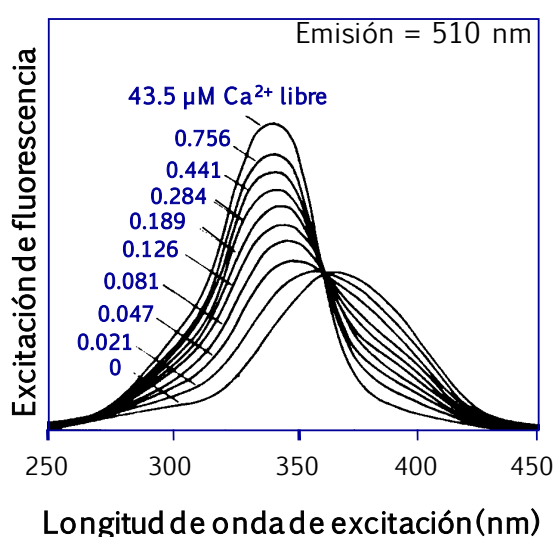
### 2.2.2. Transfecciones transitorias en células de mamífero.

Las transfecciones celulares se realizaron utilizando el reactivo catiónico Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Madrid). Este reactivo contiene unidades lipídicas que se agrupan formando liposomas en medios acuosos. Los liposomas cargados positivamente forman complejos con las cargas negativas de los ácidos nucleicos (tanto ARN como ADN) y los envuelven, de forma que la superficie de los liposomas queda cargada positivamente. Esto hace posible la fusión del liposoma con la membrana plasmática de las células vivas (cargada negativamente), permitiendo la entrada del nuevo material genético al interior celular y facilitando su acceso al núcleo durante la mitosis de la célula transfectada. Las células se

sembraron al 80-90% de confluencia y al día siguiente se incubaron con los correspondientes plásmidos y la lipofectamina, siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurridas 6 horas se cambió el medio de transfección por medio de cultivo estándar. En algunos estudios las células se tripsinizaron a las 24 horas postransfección y se sembraron posteriormente a menor densidad.

### 2.3. Técnicas de microfluorimetría: Determinación del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre se determinó utilizando un método microfluorimétrico empleando el indicador fluorescente Fura-2, según la técnica descrita por Grynkiewicz *et al.* (1985). La sonda fluorescente Fura-2 es un compuesto polianiónico hidrofílico que une  $\text{Ca}^{2+}$  de forma específica. En los ensayos se utilizó la forma acetoximetil éster, Fura-2 AM, capaz de atravesar la membrana plasmática de las células, debido a su naturaleza hidrofóbica. Una vez en el citosol, las esterasas inespecíficas rompen el enlace éster de modo que el Fura-2 liberado queda confinado en el interior celular donde une el calcio libre para formar el complejo Fura- $\text{Ca}^{2+}$ . La formación de este complejo da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose al mismo tiempo un desplazamiento hacia el ultravioleta del máximo del espectro de excitación, de 380 a 340 nm (Figura 13).



**Figura 13.** Espectros de excitación de la sonda fluorescente para el  $\text{Ca}^{2+}$ , Fura-2, en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

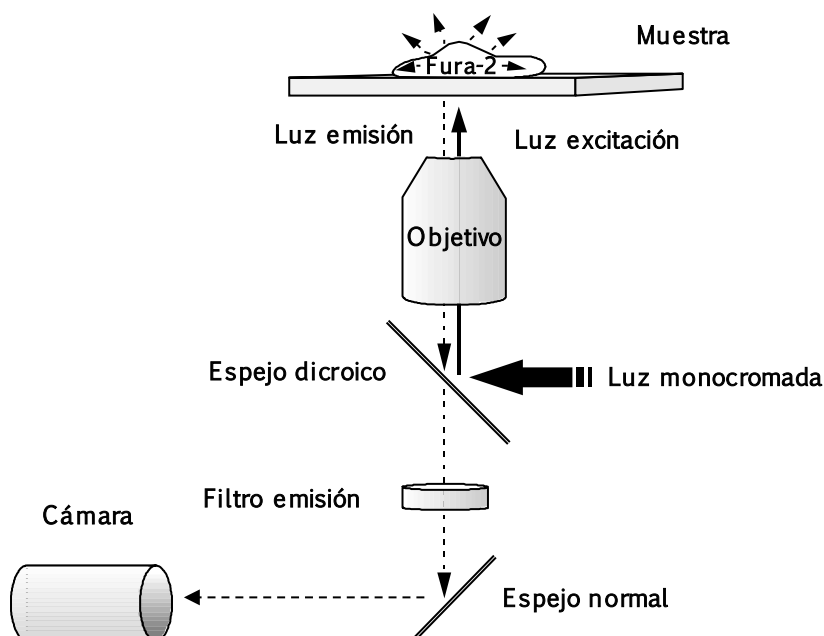
Las células se sembraron en placas de 35 mm (250.000 células/placa) que contenían cubreobjetos redondos de vidrio tratados con poli-L-lisina. Los cubreobjetos se lavaron con solución de Locke (composición: NaCl, 140 mM; KCl, 4,5 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM; glucosa, 5,5 mM; HEPES, 10 mM a un pH 7,4) y se incubaron en Locke conteniendo la sonda Fura-2 AM (5  $\mu$ M) en oscuridad durante 45 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos se lavaron con Locke y se adhirieron con grasa de vacío a la parte inferior de una cámara de perfusión (34  $\mu$ L) de metacrilato.

La cámara con las células se situó sobre la platina de un microscopio de epifluorescencia (Nikon) y se conectaron a la cámara los tubos de silicona de entrada y salida para las soluciones de perfusión. Las soluciones de entrada se encontraban en un baño termostatzado a 37°C y éste, a su vez, a una altura suficiente para que el flujo se mantuviese constante a 1,2 mL/min por simple diferencia de presión hidrostática. Tras atravesar la cámara, el medio de perfusión se aspiró de forma continua gracias a una bomba de vacío. Este sistema de perfusión continua evita que se acumule cualquier metabolito que pueda salir de las células durante la perfusión, o bien, cualquier producto de degradación de los fármacos aplicados.

Una vez montada la cámara sobre el microscopio, las células se iluminaron alternativamente con luz de 340 y 380 nm, procedente de un monocromador (Optoscan) de ancho de banda 10 nm. La selección de las longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de una solución de Fura-2 saturada de calcio (340 nm) y de una solución de Fura-2 libre de calcio (380 nm), respectivamente. El haz de luz monocromada se condujo desde una rueda de filtros hacia el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra las longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el Fura-2, de 510 nm, atraviesa el espejo dicróico y es conducida hacia la cámara ORCA-ER C 47 42-80 de Hamamatsu, después de pasar por un filtro interferencial de paso de banda

centrado a 510 nm. El tiempo de exposición de cada longitud de onda fue de 250 ms, y el tiempo que tardaba en cambiar de una longitud de onda a la otra fue inferior a 5 ms (Figura 14).

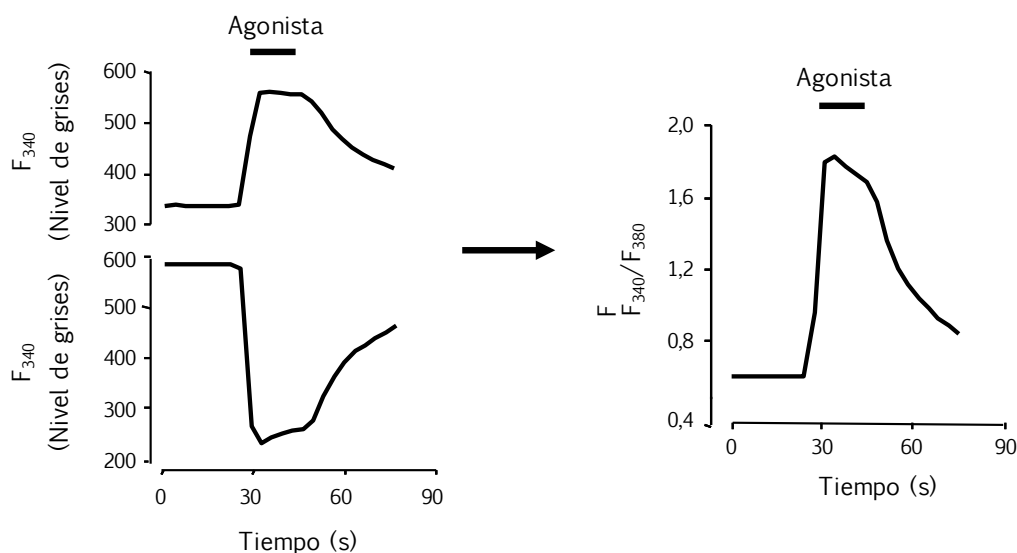
Todos los compuestos purinérgicos utilizados se disolvieron en medio Locke. En los estudios en los que se aplicaron antagonistas de P2X7, estos se preincubaron durante 5 minutos antes de la estimulación con el correspondiente agonista. Las células se visualizaron a través de un objetivo Nikon Plan Fluor 20x/0.5. Todo el equipo estuvo controlado por un ordenador con un software MetaFluor 6.3r6 PC (Universal Imaging Corp.).



**Figura 14. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría.** La luz de excitación proviene de una rueda de filtros que emite exclusivamente a la longitud de onda deseada (340 o 380 nm). El haz de luz monocromada llega al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico centrado en 430 nm y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el Fura-2 intracelular es capturada por el objetivo, atraviesa el espejo dicróico (> 430 nm) y se dirige hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm. Por último, el haz de luz llega a la cámara CCD.

Los registros de fluorescencia que se muestran en este trabajo corresponden a la relación existente entre la fluorescencia a 340 y 380 nm

( $F_{340}/F_{380}$ ), en función del tiempo, en una región elíptica situada sobre cada célula analizada. El cociente de fluorescencia  $F_{340}/F_{380}$  aumenta conforme se incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Figura 15).



**Figura 15. Cálculo de la relación de fluorescencias a cada tiempo medidas a 340 y 380 nm.** Los registros temporales de fluorescencia obtenidos para cada longitud de onda de excitación (340 y 380 nm) se dividen entre sí para obtener el cociente de fluorescencia  $F_{340}/F_{380}$ .

## 2.4. Inmunotransferencia.

Los ensayos de inmunotransferencia o Western Blot se llevaron a cabo a partir de proteínas extraídas de tejido total o de cultivos de líneas celulares.

### 2.4.1. Extracción de proteínas.

**Extracción de proteínas de tejido cerebral total.** Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y posterior decapitación. Se diseccionó la región del cerebro deseada en cada momento, se congeló rápidamente en nieve carbónica y se guardó a  $-80^{\circ}C$  hasta el momento de la extracción de proteínas. Entonces se adicionó tampón de extracción (a  $4^{\circ}C$ ) conteniendo Triton X-100 al 1% (v/v), 20 mM de HEPES (pH 7,4), 100 mM de NaCl, 10 mM de NaF, 10 mM de EDTA, 1 mM de ortovanadato sódico y una mezcla de inhibidores de

proteasas (cOmplete® Mini EDTA Free, Roche). El tejido se disgregó mediante varios pases con un mini Potter de teflón en hielo y la muestra resultante se centrifugó a 12.000 x g en microfuga a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación, en el que han quedado solubilizadas las proteínas totales, se recuperó en un tubo Eppendorf y una alícuota de este sobrenadante se reservó para medir la concentración de proteínas siguiendo el método Bradford.

**Extracción de proteínas de cultivos celulares.** El medio de cultivo se retiró en su totalidad y se realizó un lavado con tampón fosfato salino (PBS) a 4°C. A continuación, las células se recogieron en tampón de lisis a 4°C compuesto por PBS conteniendo 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 0,5 mM de EDTA, Nonidet P-40 al 1% (v/v) e inhibidores de proteasas. El extracto celular se transfirió a un tubo de microcentrífuga donde se mantuvo 1 hora en agitación a 4°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 4°C y 16.000 x g para recoger el sobrenadante que contenía el extracto total de proteínas.

#### **2.4.2. Cuantificación de las proteínas totales.**

La determinación de la concentración de proteínas presente en los extractos procedentes de los diferentes lisados se realizó mediante el método de Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de la absorbancia máxima que experimenta el colorante Azul de Comassie cuando se une a las proteínas, pasando de 465 nm a 595 nm.

La concentración de proteínas en las muestras problema se calculó interpolando los valores de absorbancia medidos a 595 nm en una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA). De este modo, conociendo la concentración de proteínas presentes en cada uno de los extractos, se pudo cargar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis.

### **2.4.3. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de las membranas.**

Se mezcló un volumen del extracto de proteínas conteniendo entre 20-30 µg de proteína con un volumen de tampón de carga concentrado 5 veces y cuya composición es la siguiente: 57% (v/v) glicerol, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS), 0,5% Azul de Bromofenol. En estas condiciones las muestras se calentaron a 99°C durante 5 minutos en un calentador multibloque y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida del porcentaje (p/v) requerido en cada caso, en presencia de SDS. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se desarrolló en un sistema mini-Protean 3 (BioRad), a un voltaje constante de 90 voltios y en tampón de electroforesis, cuya composición es la siguiente: 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0,1% SDS, pH 8,3.

Tras la separación electroforética, las proteínas problema se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman), previamente hidratadas durante 5 minutos en tampón de transferencia, utilizando un sistema mini-Trans Blot de BioRad, a una intensidad de 240 mA durante 70 minutos. La composición del tampón de transferencia fue la siguiente: 192 mM glicina, 25 mM Tris y 20% (v/v) de metanol, pH 8,3.

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 10 minutos con el colorante rojo Ponceau, que se une a las proteínas, para comprobar la correcta separación y transferencia de éstas. Posteriormente, se eliminó el colorante mediante lavados con tampón PBS conteniendo 0,1% (v/v) de Tween-20 (PBS-Tween o solución de lavado) y las membranas se incubaron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo, compuesta por leche en polvo desnatada preparada al 5% (p/v) en PBS-Tween. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario, preparado en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. La relación de los anticuerpos empleados y las diluciones utilizadas queda reflejada en la Tabla 7. Tras este paso, el exceso de anticuerpo primario se lavó con el tampón PBS-Tween y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa

(anti-IgG-HRP de ratón o conejo, en función del anticuerpo primario utilizado). Esta incubación se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el exceso de anticuerpo secundario se lavó con PBS-Tween y el revelado de las proteínas de interés se llevó a cabo incubando la membrana durante 2 minutos con el reactivo “Western Lightning Chemiluminescence”, de PerkinElmer. Este reactivo contiene luminol, que es sustrato para la peroxidasa, y que al oxidarse genera una señal luminiscente que es detectada mediante la exposición autorradiográfica a diferentes tiempos. Para ello se emplearon películas de radiografía Agfa, y se utilizó una máquina de revelado CP 1000 Agfa.

La densidad de marcaje inmunorreactivo se analizó en el sistema Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) mediante un programa específico denominado Kodak Molecular Imaging 4.0.

**Tabla 7. Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunotransferencia.**

Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Secundario
Anti-APP CTF 8717	1/1000	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra), 1/5000
Anti-P2X7R intracelular	1/250	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra), 1/5000
Anti- $\alpha$ -tubulina	1/10000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo), 1/5000
Anti-APP total clon 2211	1/5000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo), 1/5000
Anti-A $\beta$ clon WO-2	1/5000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo), 1/5000
Anti-fosfo-GSK-3 Ser 9/21	1/1000	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra), 1/5000
Anti-GSK3 $\alpha/\beta$ total	1/1000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo), 1/5000
Anti-IL-1 $\beta$	1/200	Anti-IgG de rata-HRP (cabra), 1/500



## **2.5. Inmunohistoquímica**

### **2.5.1. Obtención de secciones de cerebro**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y posterior decapitación. Se extrajeron los cerebros y se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 24 horas a 4° C. Posteriormente se lavaron con PBS a 4° C y se sometieron a un proceso de crioprotección, que consistió en la inmersión del cerebro en una solución de sacarosa al 33% durante 48 horas a 4° C (este tratamiento evita la formación de cristales de hielo que pudieran dañar al tejido durante su congelación). Finalmente, los tejidos se congelaron rápidamente en bloques de OCT (*Optimal Cutting Temperature Compound*, Tissue-Tek; Sakura) y se guardaron a -80°C hasta el momento de ser cortados.

Antes de realizar las secciones histológicas correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzasen la temperatura de corte. Se realizaron secciones sagitales o coronales de 30 µm de grosor de los cerebros en un criostato Leica y se recogieron sobre una solución de etilenglicol al 30% y glicerol al 30% en tampón fosfato (pH 7,2). Las secciones se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **2.5.2. Tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebro.**

Para realizar las tinciones inmunohistoquímicas, las secciones de cerebro se lavaron con PBS y se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 45 minutos para inhibir la peroxidasa endógena. Tras lavar de nuevo las preparaciones con PBS, las secciones se mantuvieron en solución de bloqueo (1% de BSA, 5% de suero fetal bovino (FBS) y 0,1% de Triton X-100 en PBS), durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios (ver Tabla 8) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las muestras con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (Vecstatin Elite ABC kit, Vector Laboratories) en PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con el complejo

avidina-peroxidasa (siguiendo las instrucciones de los reactivos), durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, después de lavar de nuevo con PBS, se procedió al revelado con diaminobencidina (Sigma), durante 10 minutos. La reacción se frenó lavando las preparaciones varios minutos con agua destilada. Finalmente, las preparaciones se montaron y almacenaron hasta su estudio al microscopio.

## **2.6. Inmunofluorescencia**

### **2.6.1. Inmunofluorescencia en secciones de cerebro.**

Las secciones de cerebro (apartado 2.5.1) se lavaron dos veces con PBS y se pretrataron con Sudan Black, BSA al 1% y Triton X-100 al 1% en tampón PBS antes de la incubación con los anticuerpos. Al igual que en la inmunohistoquímica, las muestras se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario (ver Tabla 8) a 4° C durante toda la noche. Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS-BSA 3% y se reveló el marcaje incubando las preparaciones con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (Alexa Fluor 488, 594 ó 647, Molecular Probes) (ver Tabla 8) durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS. Por último, los cortes se extendieron sobre portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos rectangulares usando el medio de montaje FluorSave Reagent (Calbiochem) que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Las preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4°C. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron con un microscopio confocal TCS SPE de Leica y se procesaron y presentaron utilizando los programas informáticos Adobe PhotoShop e Illustrator CS3.

### **2.6.2. Inmunofluorescencia en células N2a.**

Para los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon cubreobjetos de 35 mm donde se habían sembrado previamente las células N2a. Las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 15 minutos con PFA al 4% en PBS. A continuación se lavaron con PBS y se bloquearon durante 1 hora con PBS conteniendo Triton X-100 al 0,1%, suero de cabra al 5% y FBS al 10%. Tras el

bloqueo, se realizaron 3 lavados con BSA al 3% en PBS y, a continuación, los cubreobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios (ver Tabla 8) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-BSA 3% y se incubaron las células durante 1 hora a 37°C con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 8) acoplados a los fluorocromos Cy3 (Jackson ImmunoResearch) o Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS-BSA 3% y un tercero con PBS. Por último, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje ProLong® Antifade kit (ThermoFisher), que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Tras dejar secar el medio de montaje, las preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4°C. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio confocal Leica CTR 6500 con un objetivo de inmersión en aceite 40x.

**Tabla 8.** Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunohistoquímica (IHQ) y en inmunofluorescencia (IF).

Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Secundario
<b>Anti-P2X7 Intracelular</b>	IHQ: 1/200 IF: 1/100	IHQ: Anti-inmunoglobulinas de conejo biotiniladas (cabra) IF: Alexa 488 anti-IgG de conejo (cabra), 1/400
<b>Anti-P2Y<sub>2</sub></b>	IF: 1/100	IF: Anti-IgG de conejo-Cy3 (burro), 1/400
<b>Anti-A<math>\beta</math> clon WO2</b>	IHQ: 1/1000 IF: 1/1000	IHQ: Anti-inmunoglobulinas de ratón biotiniladas (cabra) IF: Alexa 647 anti-IgG de ratón (cabra), 1/400
<b>Anti-GFAP</b>	IHQ: 1/200 IF: 1/1000	IHQ: Anti-inmunoglobulinas de conejo biotiniladas (cabra) IF: Alexa 594 anti-IgG de conejo (cabra), 1/400
<b>Anti-Iba-1</b>	IHQ: 1/300 IF: 1/100	IHQ: Anti-inmunoglobulinas de conejo biotiniladas (cabra) IF: Alexa 594 anti-IgG de conejo (cabra), 1/400
<b>Anti-fosfo-GSK3</b>	IHQ: IF: 1/100	IHQ: Anti-inmunoglobulinas de conejo biotiniladas (cabra) IF: Alexa 594 anti-IgG de conejo (cabra), 1/400
<b>Anti-<math>\alpha</math>-tubulina</b>	IF: 1/500	IF: Alexa 488 anti-IgG de ratón (cabra), 1/400
<b>Anti-NeuN</b>	IF: 1/100	IF: Alexa 647 anti-IgG de ratón (cabra), 1/400

## 2.7. Tinción de las placas amiloides con tioflavina-T.

Las secciones de cerebro (apartado 2.5.1) se lavaron dos veces con PBS, se pretrataron con Sudan Black (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y, a continuación, fueron teñidas con tioflavina-T (Sigma-Aldrich) al 0.1% en etanol al 50% durante 10 minutos. Finalmente, las secciones fueron montadas en portaobjetos de vidrio y cubiertas con cubreobjetos usando un medio de montaje acuoso.

## **2.8. Cuantificación de placas amiloides y células gliales y microgliales.**

Para cada ratón (7 ratones por fenotipo y tratamiento) se seleccionaron 4 series (16 secciones, separadas 90 $\mu$ m, abarcando aproximadamente desde Bregma -0.95mm hasta -3.78 mm según Paxinos y Franklin, 2001) de secciones de 30 $\mu$ m de grosor. Estas secciones fueron teñidas con tioflavina-T o inmunomarcadas con anticuerpos anti-GFAP, anti-Iba-1 o anti-A $\beta$  (clon WO2), respectivamente.

Para cada serie, se contabilizó el número de placas amiloides marcadas positivamente con tioflavina-T o con anticuerpos anti-A $\beta$ . Los resultados se representan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) del número de placas amiloides por sección hipocampal. Para analizar el tamaño de los depósitos amiloides, se tomaron imágenes de áreas completas de hipocampo marcadas con el anticuerpo anti- A $\beta$  (clon WO2) a baja magnificación con una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD, de las siglas en inglés). La señal de fondo se determinó mediante análisis visual, obteniendo un valor de corte de 165-170 en una escala de 0-225 siendo 0 = blanco y 225 = negro. Se midieron las áreas negras generadas en las imágenes tras aplicar sobre ellas una máscara binaria. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) del tamaño de las placas amiloides en la región hipocampal.

Asimismo, se contabilizó el número de células astrogliales y microgliales en cada serie de secciones. Este conteo se realizó empleando imágenes de 8 bits en escala de grises del hipocampo completo, adquiridas a baja magnificación. La señal de fondo se determinó mediante análisis visual, obteniendo un valor de corte de 170 en una escala de 0-255 siendo 0 = blanco y 255 = negro. A continuación, esta señal de fondo fue restada de cada imagen y se aplicó una máscara binaria usando el software ImageJ 1.45h (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Sólo fueron considerados como células astrogliales o microgliales los eventos marcados positivamente con GFAP y anticuerpo Iba-1, respectivamente, y con un área mayor de 24.5  $\mu$ m<sup>2</sup>. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM del número de células gliales o microgliales por 0,1 mm<sup>2</sup> de área hipocampal.

## **2.9. Detección de los fragmentos carboxilo terminales (CTFs) de la APP.**

La detección de los fragmentos carboxilo terminales de la APP se llevó a cabo mediante Western Blot, a partir de extractos de proteínas procedentes del hipocampo de ratones J20 o *wild type* o lisados de cultivos celulares (apartado 2.4.1). Se cargaron 20 µg (extractos de hipocampo) o 45 µg (lisados celulares) de proteína total en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis. La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, utilizando un sistema tampón basado en Tris-Tricina (Tris-Tricina-SDS-PAGE). Este es el sistema electroforético preferido para la separación de proteínas de pequeño tamaño (< 30 kDa), como es el caso de los CTFs que se generan tras el procesamiento proteolítico de la APP por la  $\alpha$ -secretasa o la  $\beta$ -secretasa.

Tras la separación electroforética, las proteínas problema se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman). Las proteínas de interés se detectaron utilizando un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de la proteína APP humana (Anti-APP CTF 8717, Sigma), a una dilución 1:1000, o un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (1:10000, Sigma). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de conejo-HRP (1:1000) o anti-IgG de ratón-HRP (1:5000), ambos de Dako Cytomation. Las bandas inmunomarcadas se revelaron utilizando el reactivo Western Lightning Chemiluminescence (Perkin Elmer).

## **2.10. Ensayos de viabilidad celular.**

El estudio de supervivencia o viabilidad celular se llevó a cabo utilizando el compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Este ensayo colorimétrico cuantifica las células metabólicamente activas capaces de llevar a cabo la reducción del reactivo MTT (soluble y de color amarillo) a un compuesto insoluble de color azul-púrpura (formazán). Esta reducción es realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. La cantidad de

células vivas es proporcional a la cantidad de formazán generado pudiéndose determinar la actividad reductora midiendo la absorbancia a una longitud de onda próxima a 550 nm, a la que se sitúa el máximo de absorbancia del formazán.

Las células se incubaron en placas de seis pocillos. Tras el tratamiento con los diferentes agonistas o antagonistas purinérgicos, se retiró el sobrenadante de cada uno de los pocillos y se adicionaron 600  $\mu$ L de MTT (0,5 mg/mL) en solución de Locke, dejando incubar durante 2 horas a 37°C y en oscuridad. Transcurrido el periodo de incubación se añadió a cada pocillo 600  $\mu$ L de solución de solubilización (compuesta por Triton X-100 al 10% y HCl 0,1N en isopropanol anhidro), agitando durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Mediante este procedimiento se consigue lisar las células y disolver los cristales de formazán generados. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm de las muestras mediante el uso de un espectrofotómetro (Ultrospec III, Pharmacia). Los valores obtenidos se expresaron como porcentaje de la viabilidad celular con respecto a las células control (no tratadas).

## **2.11. Ensayos en ratones J20 tratados farmacológicamente.**

### **2.11.1. Tratamiento farmacológico.**

La administración *in vivo* de BBG fue realizada siguiendo el protocolo descrito previamente por Diaz-Hernandez *et al.* (2009). Los ratones fueron tratados con el antagonista de P2X7 BBG disuelto a una concentración de 3mg/ml en una solución vehículo consistente en PBS libre de calcio y magnesio suplementado con dimetil sulfóxido (DMSO) al 0,2%. El compuesto se administró intraperitonealmente a los ratones a una dosis de 45,5 mg/kg (mg compuesto/peso corporal) cada 48 horas durante 4 meses. Este régimen de administración cada 48 horas fue establecido teniendo en cuenta que se necesitan al menos 40 horas para secretar la droga no absorbida (WHO, 1970). Los animales control se trataron con la solución vehículo, siguiendo la misma relación de volumen por peso corporal. Una vez por semana se pesaba a los animales para controlar la evolución del peso y corregir posibles variaciones en la cantidad de compuesto o vehículo a

administrar. Los ratones fueron sacrificados 48 horas tras la última administración de BBG o de vehículo.

### **2.11.2. Análisis de los niveles de BBG en plasma y cerebro.**

Los niveles de BBG en plasma y cerebro fueron medidos en muestras obtenidas inmediatamente después de sacrificar a los ratones. Los niveles de BBG fueron determinados mediante análisis espectrofotométrico descrito previamente (Díaz-Hernández *et al.*, 2009). En primer lugar, se analizó el espectro de absorbancia del BBG tanto en PBS como en plasma o en homogenizado de cerebro. Se escaneó un rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm usando un espectrofotómetro (Ultrospec III, Pharmacia), obteniendo en todos los casos el máximo de absorbancia a 576 nm.

Los niveles de BBG en plasma y en homogenados de cerebro de los ratones tratados con BBG (*wild type* y J20 hAPP) se determinaron interpolando los valores de absorbancia obtenidos a 576 nm en las rectas de calibrado. Éstas se generaron empleando un rango de concentraciones conocidas de BBG, tanto en plasma como en homogenado de cerebro. En ratones tratados durante 4 meses los niveles de BBG alcanzados fueron de 15-20 $\mu$ M en plasma y de 200-220nM en cerebro.

### **2.12. Análisis estadístico de los datos.**

Los experimentos mostrados en este trabajo fueron repetidos al menos tres veces y los datos obtenidos se presentan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, Ca, USA), aplicando el análisis de la *t de Student* cuando se comparan dos grupos de valores o un análisis de la varianza (ANOVA) seguido del post-test de Bonferroni o Dunnet. Se consideraron diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .





# **Resultados**



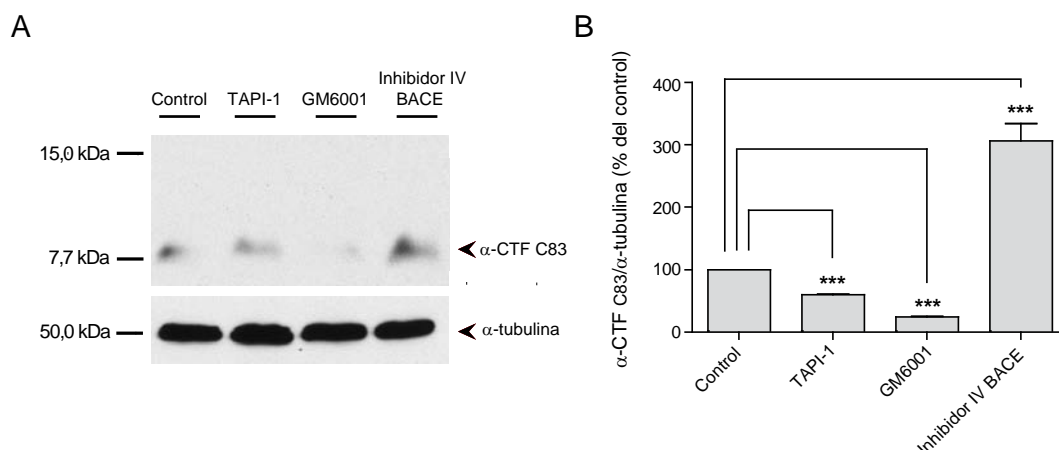
## **1. CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES P2 FUNCIONALES RESPONSABLES DE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\alpha$ -SECRETASA EN CÉLULAS Neuro-2a.**

Neuro-2a (N2a) es una línea celular tumoral derivada de la cresta neural de ratón. Estas células de neuroblastoma murino expresan un amplio repertorio de receptores de membrana acoplados a los principales sistemas de segundos mensajeros y han sido ampliamente utilizadas en el análisis de diversas vías de señalización intracelular, así como en estudios de diferenciación neuronal y crecimiento axonal. Se ha descrito previamente la presencia de un receptor P2X7 funcional en estas células, el cual estaría implicado en la regulación de la diferenciación neuronal y el crecimiento de neuritas (Gómez-Villafuertes *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Por todo ello, las células N2a constituyen un buen modelo con el que abordar el análisis del posible papel del receptor P2X7 en el procesamiento de la proteína APP.

### **1.1 Caracterización de los fragmentos carboxilo-terminales de la APP en células N2a.**

El procesamiento proteolítico de la APP por la  $\alpha$ -secretasa da lugar a la formación de un fragmento carboxilo-terminal (CTF) embebido en la membrana, de 83 aminoácidos de longitud, llamado C83. Por el contrario, el procesamiento de la APP por la  $\beta$ -secretasa puede dar como resultado la formación de dos fragmentos carboxilo terminales (CTFs) de 89 o 99 aminoácidos de longitud, llamados C89 y C99, respectivamente (Buxbaum *et al.*, 1998). Tras la rotura de la APP por la  $\alpha$ - o la  $\beta$ -secretasa, se cree que los CTFs experimentan un complejo procesamiento en el interior de la membrana, por acción del complejo multiproteína de la  $\gamma$ -secretasa (Steiner *et al.*, 2008). Para abordar el estudio de la regulación del procesamiento de la APP dependiente de secretasas, razonamos que los CTF nos proporcionarían una buena medida de dicho proceso, ya que estos fragmentos son generados en las células directamente tras la escisión de la APP por la  $\alpha$ - o la  $\beta$ -secretasa (Selkoe *et al.*, 2001). En primer lugar, caracterizamos el patrón de los CTFs en células N2a mediante separación

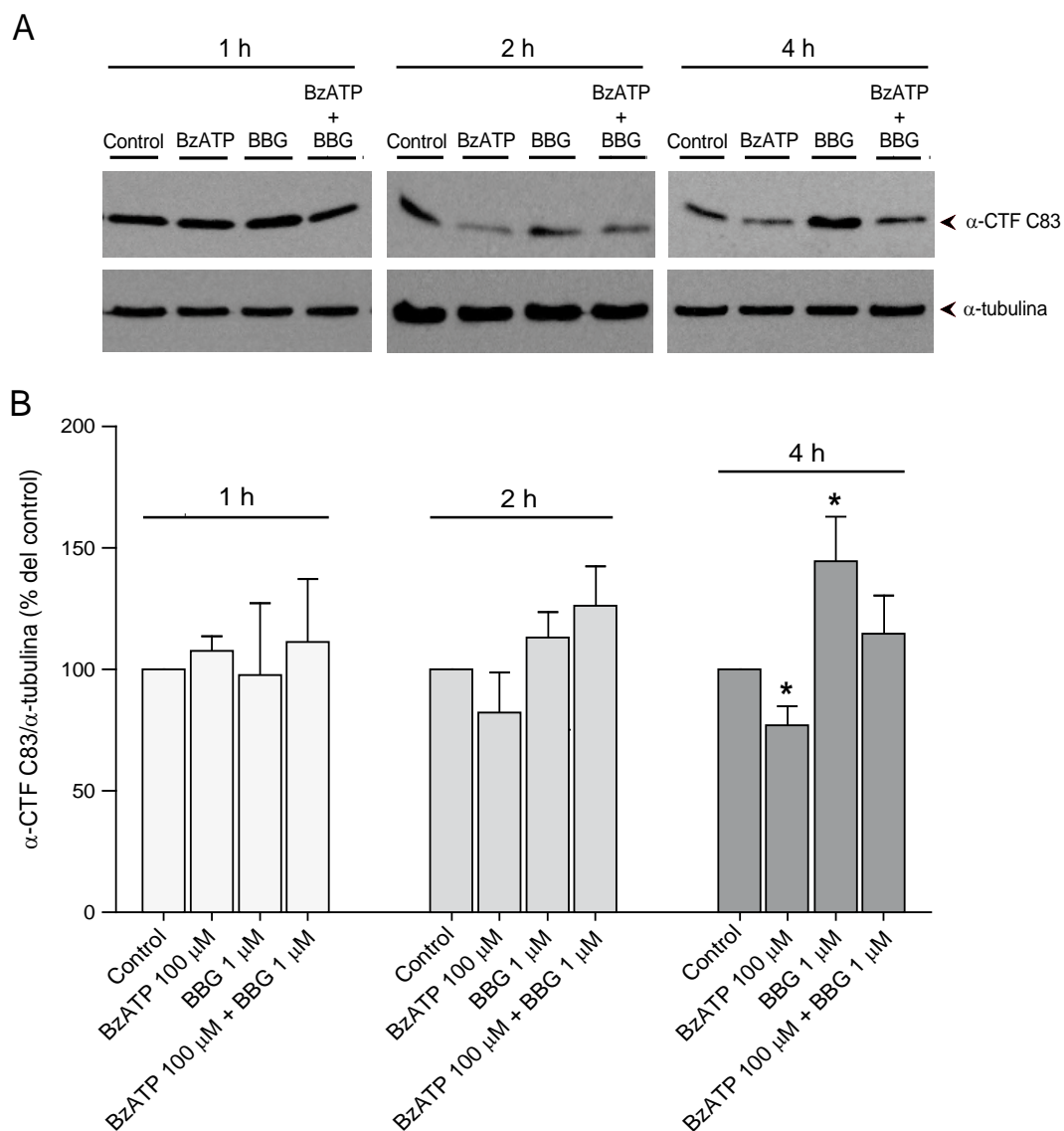
electroforética seguida por inmunotransferencia, empleando un anticuerpo comercial dirigido al extremo C-terminal de la APP. Únicamente se detectó una banda en el rango de pesos molecular esperables para los CTFs que va de ~8 a 14kDa (Figura 16A). Se ha descrito previamente que las células N2a procesan el APP mayoritariamente a través de la vía mediada por  $\alpha$ -secretasa, por lo que parece probable que esta banda se corresponda con el fragmento  $\alpha$ -CTF C83. Además, los CTFs C89 y C99 generados por la actividad  $\beta$ -secretasa deberían presentar un peso molecular superior al de la banda detectada, cuyo tamaño, sin embargo, se ajusta bien al peso molecular esperado para el fragmento C83 (~8.5 kDa). Sin embargo, para confirmar que la banda que estamos viendo es genuinamente C83 realizamos experimentos adicionales. El tratamiento de las células con el antagonista de amplio espectro de  $\alpha$ -secretasa TAPI-1 redujo de manera significativa la banda inmunorreactiva detectada (Figuras 16A y B). Un resultado similar se obtuvo al tratar las células con el inhibidor no selectivo de metaloproteasas GM6001. En cambio, el tratamiento con el inhibidor IV de  $\beta$ -secretasa (BACE) no indujo ninguna reducción en los niveles de la banda observada, sino que, al contrario, se obtuvo un marcado aumento (Figuras 16A y B). Estos datos confirmaron que la banda inmunorreactiva detectada era el fragmento C83 generado por la actividad  $\alpha$ -secretasa.



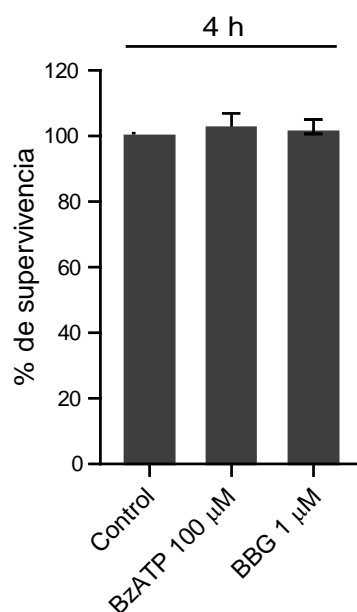
**Figura 16. Detección del fragmento carboxilo-terminal de la APP, C83, en células N2a.** Inmunoblot representativo de la detección del fragmento carboxilo terminal de la APP, C83 ( $\alpha$ -CTF C83), en células N2a tratadas con 10  $\mu$ M TAPI-1, 100  $\mu$ M GM6001 o 10  $\mu$ M de inhibidor IV de BACE (A). Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga y se calculó el cociente  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina. Los valores se representaron como porcentaje del cociente en células no tratadas (control), que se estableció como el 100%. Los datos son la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ . (B).

## 1.2 Inhibición de la actividad $\alpha$ -secretasa por el receptor P2X7.

Realizamos experimentos para determinar si la aplicación del agonista de P2X7 BzATP modificaba los niveles de  $\alpha$ -CTF C83. La estimulación de las células con 100 $\mu$ M BzATP redujo los niveles de C83 tras 2 y 4 horas de incubación, aunque esta reducción sólo fue estadísticamente significativa tras 4h de tratamiento con el análogo de nucleótido (Figuras 17A y B). Para comprobar si esta disminución en los niveles de C83 inducida por BzATP era debida a una activación de un receptor de tipo P2X7, tratamos las células N2a con BzATP en presencia o ausencia del antagonista de P2X7 BBG. 1  $\mu$ M de BBG revirtió completamente el efecto inhibitorio del BzATP (Figuras 17A y B), siendo una clara indicación de que la reducción en los niveles de C83, inducida por BzATP, está mediada por un receptor P2X7. Además, los cambios observados en los niveles de C83 no pueden ser atribuidos a ningún proceso citotóxico provocado por la exposición a las sustancias utilizadas, ya que ni BzATP ni BBG modificaron la viabilidad celular, medida por el ensayo de MTT, tras 4h de tratamiento (Figura 18).



**Figura 17. Inhibición de la actividad  $\alpha$ -secretasa por BzATP en las células N2a.** (A) Las células fueron tratadas con BzATP (100  $\mu$ M), BBG (1  $\mu$ M) o BzATP (100  $\mu$ M) en presencia de BBG (1  $\mu$ M). Los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 y  $\alpha$ -tubulina fueron cuantificados por Western blot tras diferentes tiempos de tratamiento (1, 2 o 4 horas). (B) Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los cocientes  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina normalizados con respecto al control (cociente en células no tratadas), que se estableció como el 100% (n = 4). \* $p$  < 0.05.

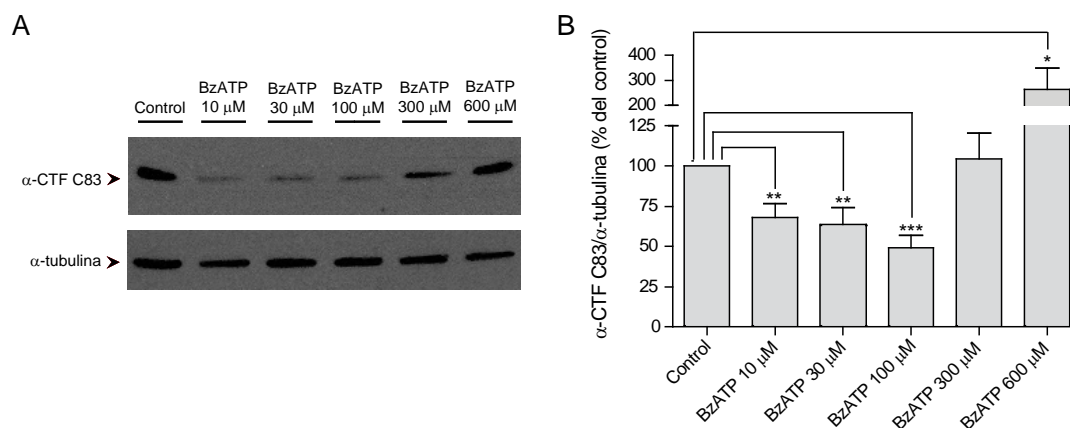


**Figura 18. Estudio de la viabilidad celular de las células N2a.** Las células fueron tratadas con BzATP (100 μM) o BBG (1 μM) y la viabilidad celular fue analizada, tras cuatro horas de tratamiento, por el método de MTT. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en triplicado.

### 1.3 Efecto bifásico del BzATP en la actividad $\alpha$ -secretasa en células N2a.

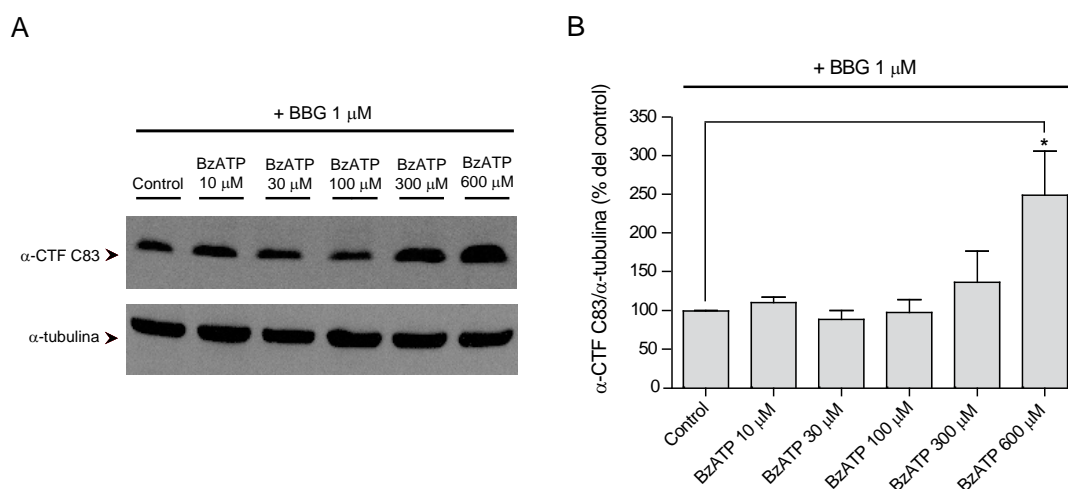
A continuación, tratamos las células con diferentes concentraciones de BzATP. Basándonos en nuestros resultados anteriores realizados a diferentes tiempos, elegimos 4h como el tiempo de incubación para llevar a cabo rutinariamente los experimentos. Al estudiar el efecto de BzATP a diferentes concentraciones, se observó un efecto bifásico de este agonista: Concentraciones bajas de BzATP (hasta 100μM) indujeron una reducción en los niveles detectados de C83, mientras que concentraciones más elevadas del nucleótido aumentaron la actividad  $\alpha$ -secretasa (Figura 19). Estos resultados sugieren que el BzATP puede estar interaccionando con dos receptores diferentes para modificar la actividad  $\alpha$ -secretasa.





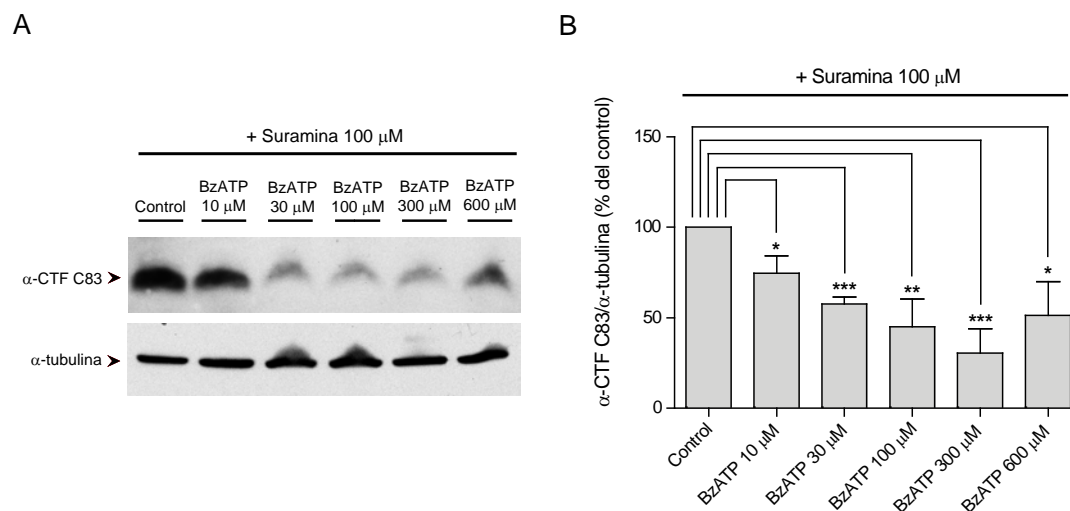
**Figura 19. El BzATP activa dos receptores de nucleótidos diferentes, con efectos opuestos sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa.** (A) Las células N2a fueron estimuladas con distintas concentraciones de BzATP, en el rango de 10  $\mu$ M a 600  $\mu$ M, y se analizaron, mediante Western blot, los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 y  $\alpha$ -tubulina en los lisados celulares tras cuatro horas de tratamiento con el BzATP. (B) Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los cocientes  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina normalizados con respecto al control, en doce experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Como habíamos demostrado previamente que el efecto inhibitorio de BzATP, a 100 $\mu$ M, puede ser revertido por BBG 1 $\mu$ M (Figura 17), repetimos la curva dosis-respuesta para BzATP en presencia de este antagonista de P2X7. El BBG previno completamente el efecto inhibitorio del BzATP en la actividad  $\alpha$ -secretasa, mientras que el componente estimulador observado a concentraciones más elevadas de BzATP, no se vio afectado por la presencia del antagonista (Figura 20).



**Figura 20. El antagonista BBG previene el efecto inhibitorio del BzATP sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa.** (A) Las células N2a fueron preincubadas con 1  $\mu$ M BBG durante 30 minutos y a continuación se estimularon con diferentes concentraciones de BzATP, en el rango de 10  $\mu$ M a 600  $\mu$ M. Mediante Western blot se analizaron los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 y  $\alpha$ -tubulina en los lisados celulares, tras cuatro horas de tratamiento con el BzATP. (B) Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los cocientes  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina, normalizados con respecto al control, en seis experimentos independientes. \* $p < 0.05$ .

Estos resultados apoyan nuestra hipótesis anterior de que el BzATP inhibe la actividad  $\alpha$ -secretasa a través de su interacción con un receptor P2X7. El efecto estimulador del BzATP sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa, parece estar mediado, en cambio, por un receptor diferente, resistente a BBG. Se ha descrito que el receptor P2X7 es bastante insensible a suramina (Gever *et al.*, 2006), un antagonista no selectivo capaz de inhibir la mayoría de los subtipos de receptores P2 (Gever *et al.*, 2006; Abbracchio *et al.*, 2006). Al realizar los ensayos en presencia de suramina 100 $\mu$ M, el BzATP no mostró ningún efecto estimulador sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa, pero sí se observó una reducción en los niveles de C83 a cualquiera de las concentraciones de agonista ensayadas (Figura 21).

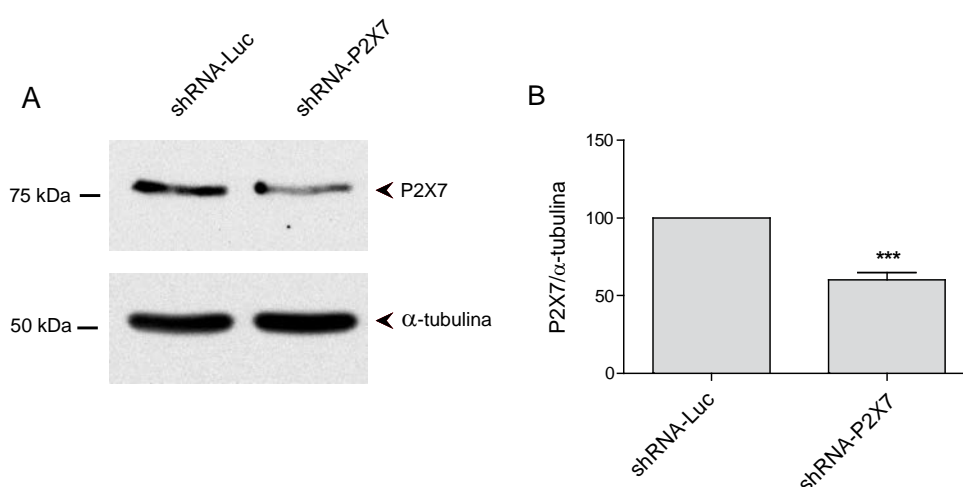


**Figura 21. La suramina inhibe el efecto estimulador del BzATP sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa.** (A) Las células N2a fueron preincubadas con 100  $\mu$ M de suramina durante 30 minutos y a continuación se estimularon con diferentes concentraciones de BzATP, en el rango de 10  $\mu$ M a 600  $\mu$ M. Mediante Western blot se analizaron los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 y  $\alpha$ -tubulina en los lisados celulares, tras cuatro horas de tratamiento con el BzATP. (B) Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los cocientes  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina, normalizados con respecto al control, en seis experimentos independientes. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001.

En resumen, estos resultados demuestran claramente que el BzATP, dependiendo de su concentración, puede activar dos receptores de nucleótidos diferentes en las células N2a. Estos receptores pueden ser diferenciados farmacológicamente y tienen efectos opuestos sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa. Uno de ellos, que predomina a las concentraciones más bajas de BzATP y cuya activación lleva a una reducción en la actividad  $\alpha$ -secretasa, es inhibido por 1  $\mu$ M BBG, pero se ha visto que es resistente a suramina 100 $\mu$ M. Estos resultados apuntan claramente a un receptor P2X7 como el responsable de la reducción en la actividad  $\alpha$ -secretasa mediada por BzATP. El otro receptor, que parece ser activado a concentraciones mayores de BzATP y cuyo efecto es aumentar la actividad  $\alpha$ -secretasa, muestra un perfil de inhibición completamente diferente, siendo insensible a BBG e inhibido por suramina.

#### 1.4 El silenciamiento del receptor P2X7 previene el efecto inhibitorio de BzATP sobre la actividad $\alpha$ -secretasa.

Para silenciar la expresión del receptor P2X7 nativo se diseñó un shRNA (“small hairpin RNA”) clonado en el vector pSuper.neo/gfp. La transfección de las células N2a con dicho vector (shRNA-P2X7) redujo específicamente la expresión de la proteína P2X7R al compararlo con células control, que fueron transfectadas con un vector no específico shRNA-luciferasa (shRNA-Luc) (Figura 22).



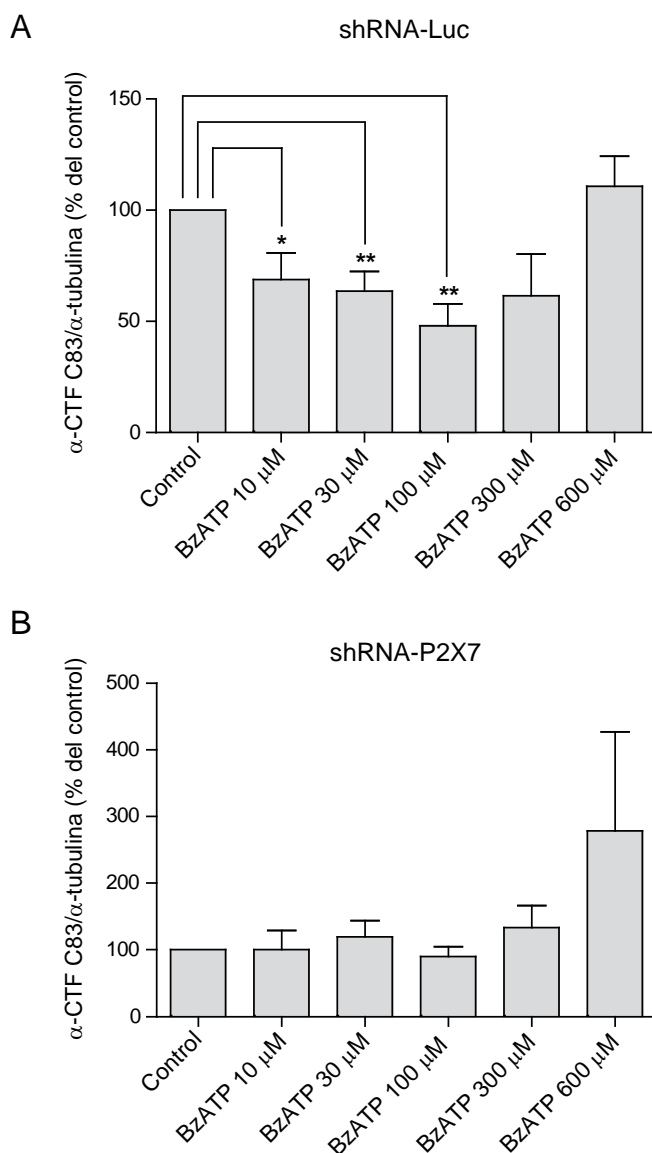
**Figura 22. Silenciamiento del receptor P2X7 en las células N2a** (A) Western blot de las células N2a transfectadas con el RNA de interferencia para el receptor P2X7 (shRNA-P2X7) o con un vector no específico shRNA-luciferasa (shRNA-Luc). Los niveles de  $\alpha$ -tubulina se utilizaron como control de carga (B) El cociente P2X7/ $\alpha$ -tubulina fue utilizado para estimar la eficiencia del silenciamiento del receptor P2X7. \*\*\* $p < 0.001$ .

A continuación, analizamos el efecto de BzATP en los niveles de C83 en células transfectadas tanto con shRNA-P2X7 como con shRNA-Luc (Figura 23). Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de suramina 100 $\mu$ M para reducir, en lo posible, la contribución del receptor capaz de estimular la actividad  $\alpha$ -secretasa. Sin embargo, la suramina parece ser ligeramente menos efectiva en las células transfectadas, siendo incapaz de evitar completamente la participación de dicho receptor.

Se obtuvo una curva bifásica para el BzATP en las células control (transfectadas con shRNA-Luc), siendo este agonista capaz de reducir la actividad

$\alpha$ -secretasa únicamente a las concentraciones más bajas (hasta 100 $\mu$ M) (Figura 23A). A concentraciones mayores de BzATP la activación del receptor estimulador de  $\alpha$ -secretasa parece contrarrestar el efecto inhibitorio observado a concentraciones inferiores del agonista.

Sin embargo, es importante señalar que el efecto inhibitorio de BzATP sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa desaparece completamente cuando el receptor P2X7 ha sido silenciado, siendo este agonista incapaz de reducir los niveles de C83 en las células transfectadas con shRNA-P2X7 a ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 23B).

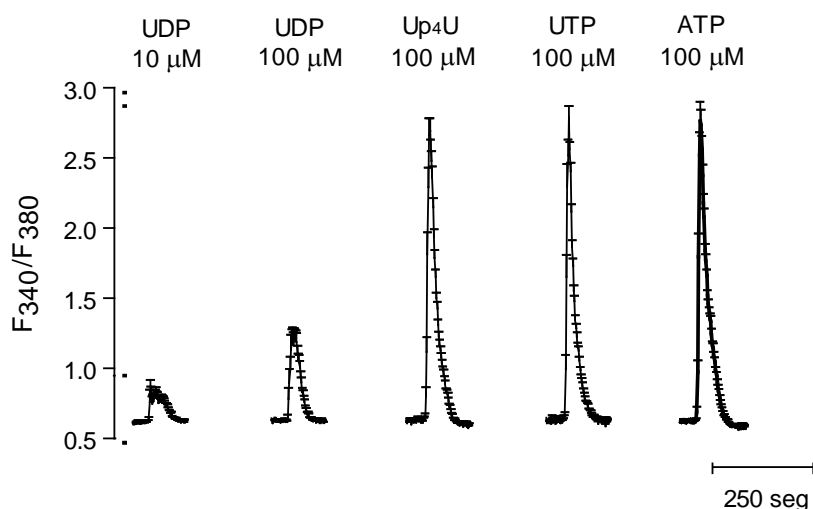


**Figura 23. El BzATP induce la inhibición de  $\alpha$ -secretasa a través de la activación del receptor P2X7** Se aplicaron distintas concentraciones de BzATP, en el rango de 10  $\mu$ M a 600  $\mu$ M, en presencia de 100  $\mu$ M de suramina, a células transfectadas con un vector no específico shRNA-luciferasa (shRNA-Luc) (A) o con el RNA de interferencia para el receptor P2X7 (shRNA-P2X7) (B). La suramina fue preincubada durante 30 minutos antes de la adición del agonista BzATP. Los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 y  $\alpha$ -tubulina se cuantificaron, mediante Western blot, tras 4 horas de tratamiento con el BzATP. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los cocientes  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina normalizados con respecto al control (células no estimuladas con BzATP), en cinco experimentos independientes. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01.

### 1.5 El receptor P2Y<sub>2</sub> media el aumento de la actividad $\alpha$ -secretasa inducida por BzATP.

Los resultados presentados hasta ahora demuestran claramente que los efectos inhibitorios del BzATP sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa están mediados por un receptor P2X<sub>7</sub>, ya que tanto el bloqueo farmacológico del receptor como la reducción de su expresión con herramientas de biología molecular, previenen completamente la disminución en la actividad  $\alpha$ -secretasa inducida por BzATP (Figuras 20 y 23).

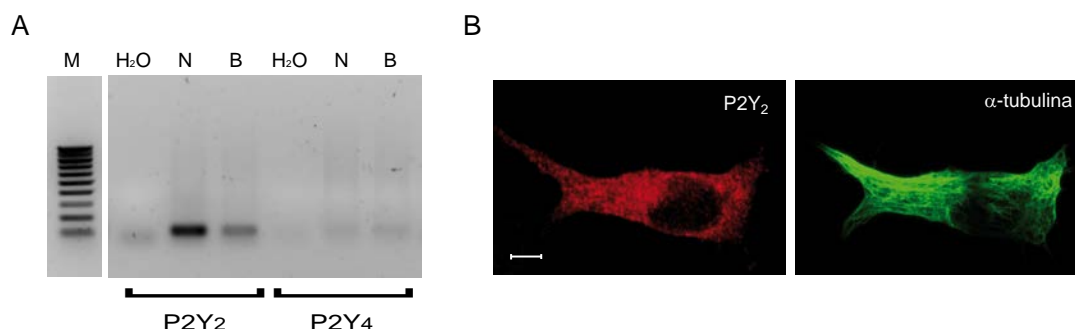
Sin embargo, es necesario aclarar la naturaleza del receptor responsable del aumento en la actividad  $\alpha$ -secretasa inducido por BzATP. Se ha descrito que el procesamiento de APP dependiente de  $\alpha$ -secretasa puede ser acrecentado mediante la activación de un receptor P2Y<sub>2</sub> (Camden *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2009). Además, los receptores P2Y<sub>2</sub> pueden ser activados por BzATP (Wildman *et al.*, 2003) y son sensibles a la inhibición por suramina (Abbracchio *et al.*, 2006), características farmacológicas que son compartidas por nuestro receptor estimulante de la actividad  $\alpha$ -secretasa. Para analizar si un receptor P2Y<sub>2</sub> pudiera ser el responsable de la estimulación de la actividad  $\alpha$ -secretasa inducida por BzATP en las células N2a, empleamos varios enfoques experimentales. En primer lugar, analizamos las respuestas de calcio al estimular las células con diferentes agonistas nucleotídicos que activan receptores P2Y<sub>2</sub>. Se ha descrito que el receptor P2Y<sub>2</sub> es activado equipotentemente por ATP y UTP, mientras que el UDP es un agonista menos efectivo (Abbracchio *et al.*, 2006). Además de los nucleótidos trifosfato, el receptor también responde a dinucleósido tetrafosfatos, como el Ap<sub>4</sub>A o el Up<sub>4</sub>U (Pendergast *et al.*, 2001). Como se puede observar en la Figura 24, concentraciones idénticas de UTP y ATP (100  $\mu$ M) provocaron similares incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  en las células N2a, mientras que el UDP dio lugar a respuestas de mucha menor amplitud. Las células N2a también mostraron aumentos transitorios de  $[Ca^{2+}]_i$  tras la aplicación de Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M, siendo este patrón de respuestas compatible con la presencia de un receptor P2Y<sub>2</sub> funcional (Abbracchio *et al.*, 2006; Pendergast *et al.*, 2001).



**Figura 24. Incrementos de calcio intracelular inducidos por diferentes agonistas nucleotídicos en las células N2a.** Las células fueron estimuladas durante 30 segundos con ATP (100  $\mu\text{M}$ ), UTP (100  $\mu\text{M}$ ), Up<sub>4</sub>U (100  $\mu\text{M}$ ) y UDP (10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y se midieron los incrementos transitorios de calcio, mediante el uso de la sonda fluorescente Fura2 AM. Los registros representan la media  $\pm$  SEM de 156 células individuales.

Se puede descartar la implicación de otros receptores P2 activados por pirimidinas, como el P2Y<sub>6</sub>, ya que éste es un receptor mucho más afín por los nucleósidos difosfato, siendo el UDP un agonista mucho más potente que el UTP (Abbracchio *et al.*, 2006). Sin embargo, basándonos en este perfil farmacológico no podemos descartar la participación de un receptor de tipo P2Y<sub>4</sub>, ya que este receptor ha demostrado ser sensible a Up<sub>4</sub>U (Pendergast *et al.*, 2001), siendo su ortólogo de ratón activado equipotentemente por ATP y UTP (Abbracchio *et al.*, 2006).

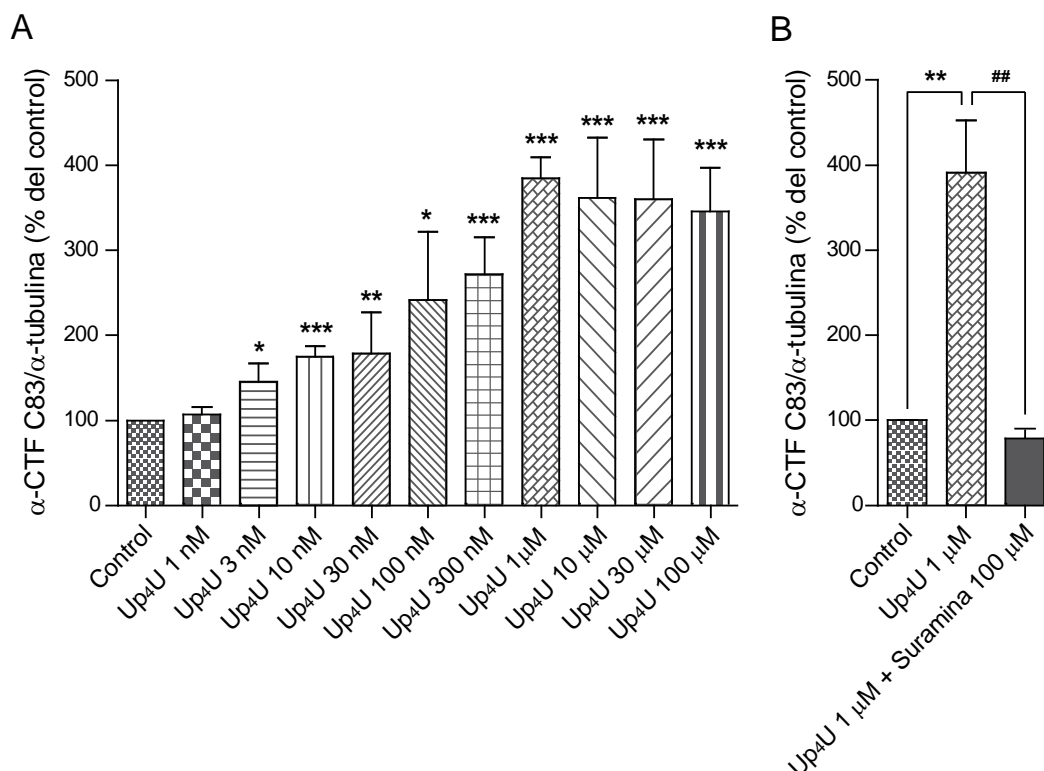
Para poder elucidar si hay receptores P2Y<sub>2</sub> y/o receptores P2Y<sub>4</sub> presentes en las células N2a, analizamos la expresión de ambos receptores a nivel transcripcional. Análisis de RT-PCR demostraron que sólo los receptores P2Y<sub>2</sub> son expresados a un nivel cuantificable en células N2a (Figura 25A). Ensayos inmunocitoquímicos confirmaron la presencia de receptores P2Y<sub>2</sub> en estas células (Figura 25B).



**Figura 25. Expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en las células N2a.** (A) La expresión de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> fue analizada por RT-PCR en células N2a, N, y extractos de RNAm de cerebro de ratón adulto, B. H<sub>2</sub>O, control llevado a cabo en ausencia de molde. M, marcador de DNA Direct Load™ Wide Range. (B) Detección inmunocitoquímica del receptor P2Y<sub>2</sub> en células N2a (rojo). La morfología celular fue definida usando anticuerpos anti  $\alpha$ -tubulina (verde). Barra de escala, 5  $\mu$ m.

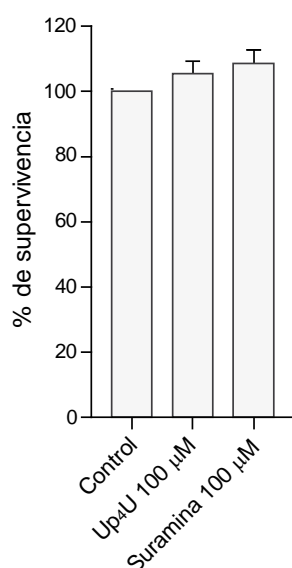
Una vez establecida la presencia de un receptor P2Y<sub>2</sub> funcional en las células N2a nos preguntamos si la activación de dicho receptor daría lugar a aumentos en la actividad  $\alpha$ -secretasa. La estimulación de las células con el agonista de P2Y<sub>2</sub> Up<sub>4</sub>U aumentó los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 de manera dependiente de concentración ( $pEC_{50}$ ,  $6,96 \pm 0.20$ ;  $n_H$   $0.96 \pm 0.38$ ), alcanzando la saturación a aproximadamente 1.0  $\mu$ M del ligando añadido (Figura 26A). Además, las respuestas a Up<sub>4</sub>U fueron inhibidas por suramina (Figura 26B), lo cual es también una característica farmacológica del receptor P2Y<sub>2</sub>.





**Figura 26. La activación del receptor P2Y<sub>2</sub> incrementa la actividad  $\alpha$ -secretasa en las células N2a.** (A) Las células fueron estimuladas con diversas concentraciones de Up<sub>4</sub>U, en el rango de 1 nM a 100  $\mu$ M. Los niveles de  $\alpha$ -CTF C83 y  $\alpha$ -tubulina se cuantificaron, por Western blot, tras 4 horas de tratamiento con el agonista P2Y<sub>2</sub>. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los cocientes  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina, normalizados con respecto al control (células no estimuladas), en cinco experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . (B) Las células N2a fueron preincubadas con 100  $\mu$ M de suramina y estimuladas con las mismas concentraciones de Up<sub>4</sub>U usadas en (A), pero en presencia del antagonista. Se muestran los resultados obtenidos a 1  $\mu$ M de Up<sub>4</sub>U. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los cocientes  $\alpha$ -CTF C83/ $\alpha$ -tubulina, normalizados con respecto al control, en cuatro experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ , control vs 1  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U; ## $p < 0.01$ , 1  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U vs 1  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U + 100  $\mu$ M suramina.

El tratamiento con Up<sub>4</sub>U (incluso a la concentración más elevada empleada, 100  $\mu$ M) o con suramina (100  $\mu$ M) no modificó la viabilidad celular, la cual fue evaluada por el método de MTT (Figura 27).



**Figura 27. Estudio de la viabilidad celular de las células N2a.** Las células fueron incubadas con Up<sub>4</sub>U (100  $\mu$ M) o suramina (100  $\mu$ M) y la viabilidad celular fue analizada, tras cuatro horas de tratamiento, por el ensayo de MTT. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en triplicado.

Con todos estos resultados obtenidos parece razonable concluir que el aumento en la actividad  $\alpha$ -secretasa observado a concentraciones elevadas de BzATP (superiores a 100 $\mu$ M) está mediado por un receptor P2Y<sub>2</sub>, teniendo en cuenta que el BzATP ha sido descrito previamente como un activador de este tipo de receptor (Wildman *et al.*, 2003) y que estas respuestas a BzATP se vieron reducidas en presencia de suramina (Figuras 21A y B).

## **2. EL RECEPTOR P2X7 MODULA LA ACTIVIDAD $\alpha$ -SECRETASA A TRAVÉS DE GSK-3.**

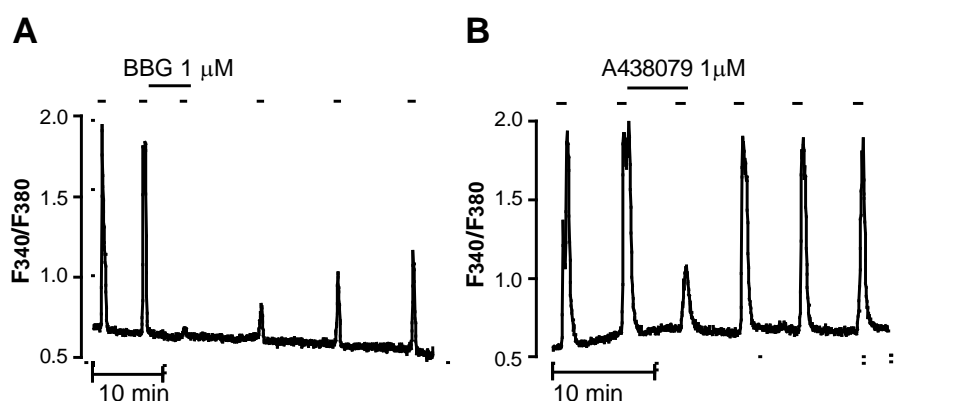
A partir de los resultados previos ha quedado demostrado que la activación del receptor P2X7 inhibe la actividad  $\alpha$ -secretasa en las células N2a. A continuación, nos preguntamos si, de manera inversa, el bloqueo del receptor P2X7 podría conducir a incrementos en la actividad de este enzima, favoreciendo de esta manera el procesamiento no amiloidogénico de la APP, lo que abriría la posibilidad del uso de antagonistas P2X7 en el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Alzheimer.

Por otra parte, se ha descrito previamente la modulación de la actividad GSK-3 por el receptor P2X7 en neuronas de hipocampo (Díaz-Hernández *et al.*, 2008). Cambios en la actividad GSK-3 modifican la producción del péptido A $\beta$  y

se ha demostrado que la administración de litio, un inhibidor de GSK-3, reduce los depósitos amiloides en ratones transgénicos modelo de AD (Phiel *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2004; Rockenstein *et al.*, 2007). A la vista de estos resultados, nos preguntamos si la acción del receptor P2X7 sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa, que conduciría a cambios en el procesamiento de la APP y la generación del péptido A $\beta$ , pudiera estar mediada a través de GSK-3.

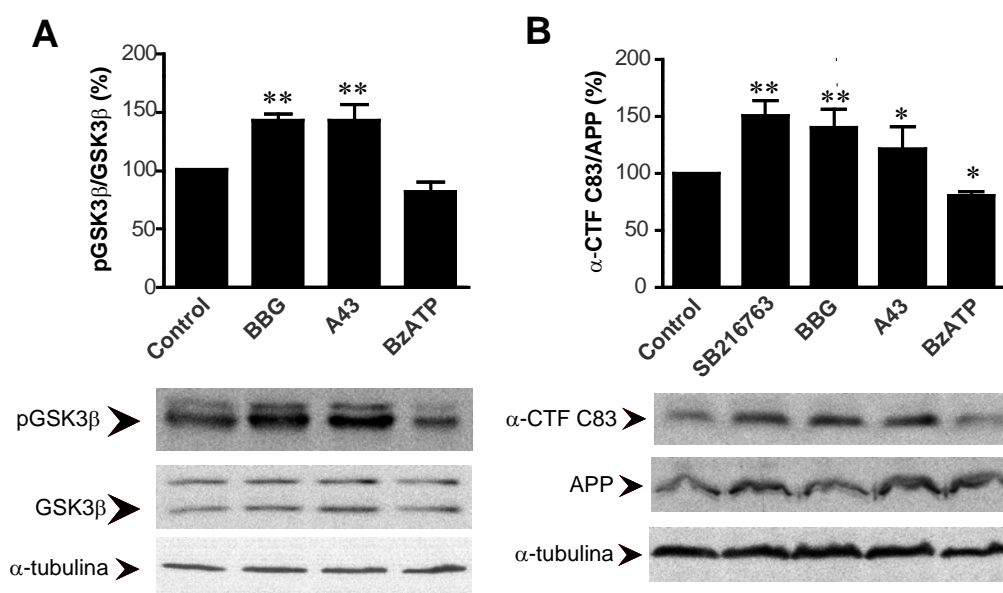
## 2.1 El antagonismo del receptor P2X7 modifica el estado de fosforilación de GSK-3 y la actividad $\alpha$ -secretasa en las células N2a.

En células N2a, las respuestas de calcio inducidas por BzATP 100 $\mu$ M pueden ser bloqueadas por dos antagonistas del receptor P2X7: BBG (1 $\mu$ M) y A438079 (1 $\mu$ M). El BBG actúa como un antagonista lentamente reversible, dando lugar a la inhibición de la respuesta a BzATP durante 25-30 minutos después del lavado (Figura 28A). En cambio, el efecto antagonista de A438079 fue revertido rápidamente tras el lavado (Figura 28B).



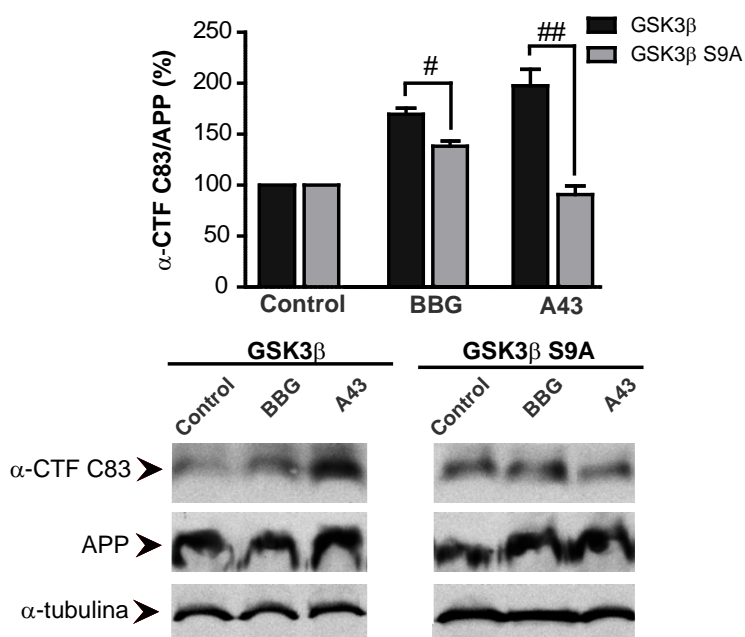
**Figura 28. Antagonismo del receptor P2X7 por BBG y A438079.** Incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  en células N2a inducidos por 100  $\mu$ M BzATP en presencia o ausencia de BBG 1  $\mu$ M (A) o A438079 1  $\mu$ M (B) ( $n = 55$ ). Las barras en la parte superior de las figuras indican los intervalos de aplicación del agonista BzATP o del correspondiente antagonista.

El bloqueo del receptor P2X7, por parte tanto de BBG como de A438079, indujo un aumento significativo en la fosforilación en serina 9/21 de la enzima GSK-3 (Figura 29A) y un aumento significativo en el producto de la  $\alpha$ -secretasa  $\alpha$ -CTF C83 (Figura 29B). Por otra parte, se observó un aumento en la producción del fragmento C83 en respuesta al inhibidor selectivo de GSK-3 SB216763 1  $\mu$ M (Figura 29B), lo que indica la mediación de GSK-3 en la actividad  $\alpha$ -secretasa. Por el contrario, se observó un descenso significativo en los niveles del fragmento C83 tras la estimulación de las células N2a con BzATP, lo cual indujo un descenso paralelo, aunque no significativo en la fosforilación de GSK-3 (Figuras 29 A y B).



**Figura 29. El antagonismo del receptor P2X7 modifica la actividad de GSK-3 y  $\alpha$ -secretasa en las células N2a.** (A) Detección por Western blot de p-GSK-3 $\beta$  (pSer<sup>9</sup>) y GSK-3 $\beta$  total en células N2a tratadas durante 4 horas con BBG 1  $\mu$ M, A438079 1  $\mu$ M o BzATP 100  $\mu$ M. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del cociente p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$  total en tres experimentos independientes realizados en duplicado. (B) Inmunoblot representativo de la detección de  $\alpha$ -CTF C83 y APP total en células N2a tratadas con BzATP 100  $\mu$ M, BBG 1  $\mu$ M, SB216763 1  $\mu$ M o A438079 1  $\mu$ M. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del cociente  $\alpha$ -CTF C83/APP en cuatro experimentos independientes realizados en duplicado. En todos los casos se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga y el valor del 100% corresponde al cociente obtenido en células no tratadas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

La participación de GSK-3 en la producción del fragmento C83 fue confirmada transfectando las células N2a con una enzima GSK-3 mutada, en la que la serina 9 está reemplazada por una alanina (GSK-3 S9A). Esta mutación previene la inhibición de GSK-3 por fosforilación en serina 9. Como se muestra en la Figura 30, la presencia de GSK-3 S9A evitó el aumento en la producción de C83 inducida por la inhibición de P2X7.

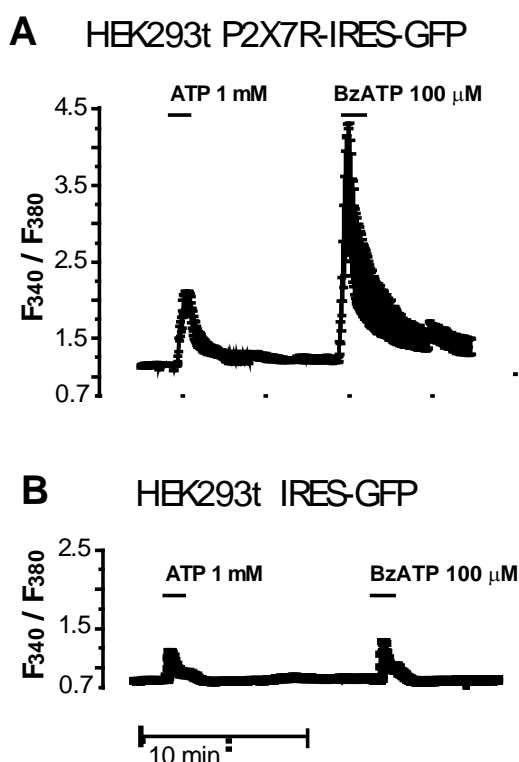


**Figura 30. Implicación de GSK-3 en la producción del fragmento C83 inducida por la inhibición de P2X7.** (A) Detección por Western blot de  $\alpha$ -CTF C83 y APP total en células N2a transfectadas con pcDNA-GSK-3 $\beta$  o pcDNA-GSK3 $\beta$ S9A y tratadas durante 4 horas con BBG 1  $\mu$ M o A438079 1  $\mu$ M. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del cociente  $\alpha$ -CTF C83/APP, normalizado con respecto al control (células no tratadas), en cuatro experimentos independientes realizados en duplicado. # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ .

## 2.2 Modulación de la actividad GSK-3 y $\alpha$ -secretasa por el receptor P2X7 expresado heterológamente en células HEK.

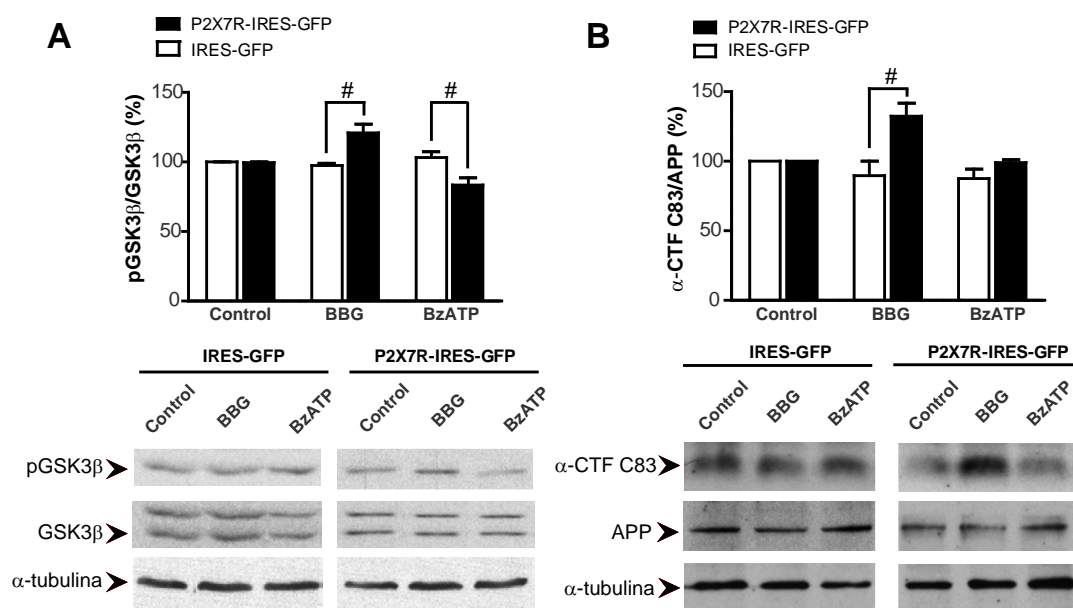
Para confirmar el efecto regulador del receptor P2X7 en la actividad  $\alpha$ -secretasa, expresamos el vector P2X7-IRES-GFP en células HEK293t, una línea celular que carece de receptor P2X7 nativo. La estimulación con BzATP (100  $\mu$ M) de las células transfectadas que expresan P2X7, indujo una

robusta respuesta de calcio, 3 veces más elevada que la inducida por ATP (1mM) (Figura 31A). Sin embargo, en células transfectadas con el vector vacío IRES-GFP, tanto ATP (1mM) como BzATP (100  $\mu$ M) produjeron aumentos débiles de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 31B).



**Figura 31. Expresión heteróloga de un receptor P2X7 funcional en células HEK.** Incrementos de calcio intracelular inducidos por ATP 1mM o BzATP 100  $\mu$ M en células HEK293t transfectadas con el vector P2X7-IRES-GFP (A) o el vector vacío IRES-GFP (B). Los registros representan la media  $\pm$  SEM de al menos 50 células individuales.

Por otra parte, la estimulación con BzATP (100 $\mu$ M) de las células transfectadas con el vector P2X7-IRES-GFP, indujo una reducción significativa en la fosforilación de GSK-3 (Figura 32A), mientras que, tal y como se vio en las células N2a, la inhibición de P2X7 con BBG 1 $\mu$ M aumentó significativamente tanto el estado de fosforilación de GSK-3 como la producción del fragmento C83 (Figuras 32 A y B).



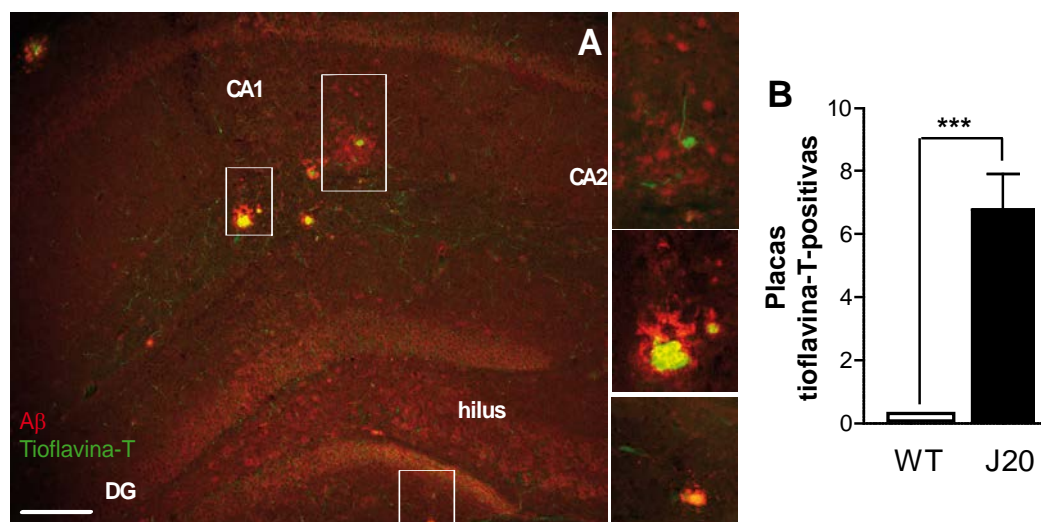
**Figura 32. Modulación de la actividad de GSK3 y  $\alpha$ -secretasa por el receptor P2X7 expresado heterológicamente en células HEK.** (A) Detección por Western blot de GSK-3 total y GSK-3 fosforilada en células HEK transfectadas con P2X7-IRES-GFP o IRES-GFP y tratadas durante 4 horas con BBG 1  $\mu$ M o BzATP 100  $\mu$ M. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del cociente p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$  en cuatro experimentos independientes realizados en duplicado. (B) Inmunoblot representativo de la detección de  $\alpha$ -CTF C83 y APP total en células HEK transfectadas con P2X7-IRES-GFP o IRES-GFP y tratadas con BBG 1  $\mu$ M o BzATP 100  $\mu$ M. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del cociente  $\alpha$ -CTF C83/APP en cuatro experimentos independientes realizados en duplicado. En todos los casos se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga y el valor del 100% corresponde al cociente obtenido en células no tratadas. <sup>#</sup> $p < 0.05$ .

### 3. LA INHIBICIÓN *IN VIVO* DE P2X7 DISMINUYE LAS PLACAS AMILOIDES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER MEDIANTE GSK-3 Y SECRETASAS.

#### 3.1 El antagonismo *in vivo* de P2X7 previene la hipofosforilación de GSK-3 observada en los ratones J20.

Los ratones J20 comienzan a desarrollar depósitos amiloides en el hipocampo a la edad de 6-8 meses. Como se muestra en las Figuras 33 A y B, estas placas amiloides pueden ser teñidas tanto con anticuerpos frente al péptido

A $\beta$  como con el colorante tioflavina-T, una sal de benzotiazol que incrementa su fluorescencia al unirse a los agregados de amiloide.

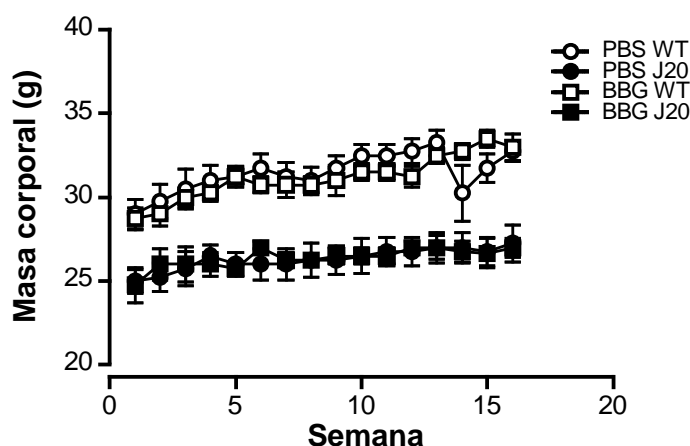


**Figura 33. Cuantificación de las placas de  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) en el hipocampo de ratones J20.** (A) Las placas A $\beta$  se tiñeron con el colorante tioflavina-T y con anticuerpos anti-A $\beta$  WO2 en el hipocampo de ratones J20 de 8 meses de edad. Los insertos muestran la magnificación 2X de las áreas identificadas en (A). Barra de escala, 100  $\mu$ m. Abreviaturas: DG, giro dentado (*dentate gyrus*). (B) Las barras muestran el promedio del número de placas presentes en el hipocampo de ratones J20 de 6 a 8 meses de edad, comparados con los correspondientes *wild type*. Se analizaron 16 secciones por ratón ( $n = 7$  ratones por genotipo). \*\*\* $p < 0.001$ .

Para investigar el papel potencial del receptor P2X7 en la formación de placas amiloides, ratones J20 de 3-4 meses de edad (es decir, 4 meses antes de la aparición de las primeras placas hipocampales) y sus hermanos de camada *wild type*, fueron tratados con solución vehículo (PBS) o con BBG durante 16 semanas. Los ratones fueron pesados semanalmente y así la dosis de BBG fue ajustada en consecuencia. A pesar de que los ratones J20 presentan una masa corporal menor que los ratones *wild type* a la edad a la que los depósitos de amiloide comienzan a formarse (Deacon *et al.*, 2008), no se observaron alteraciones significativas en el peso corporal a lo largo del tratamiento (Figura 34). Con esta dosis, la concentración de BBG alcanzada en el cerebro de los ratones tratados fue de entre 160 y 220 nM (ver Materiales y Métodos); por lo tanto, en el rango de IC<sub>50</sub> del BBG para antagonizar el receptor P2X7 (10 – 200 nM) (Jiang *et al.*, 2000)

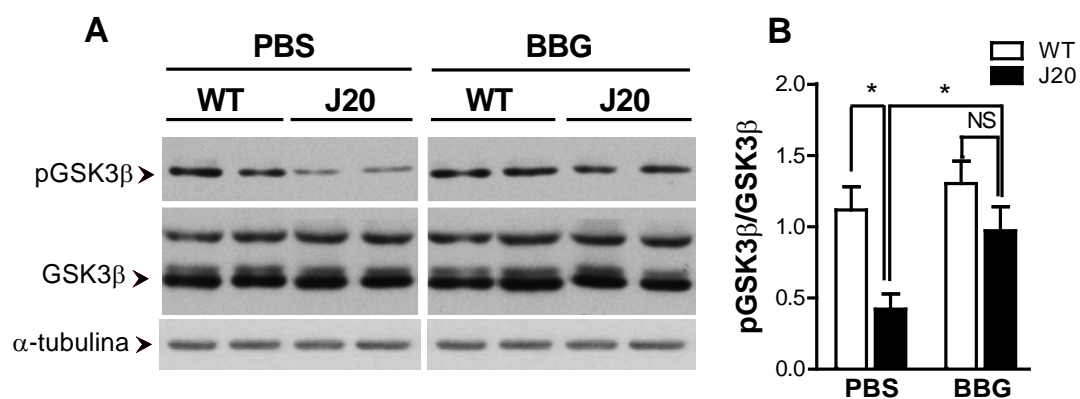


y un orden de magnitud por debajo de LD<sub>50</sub> (dosis letal media) de Brilliant Blue-CFC (Gross, 1961).



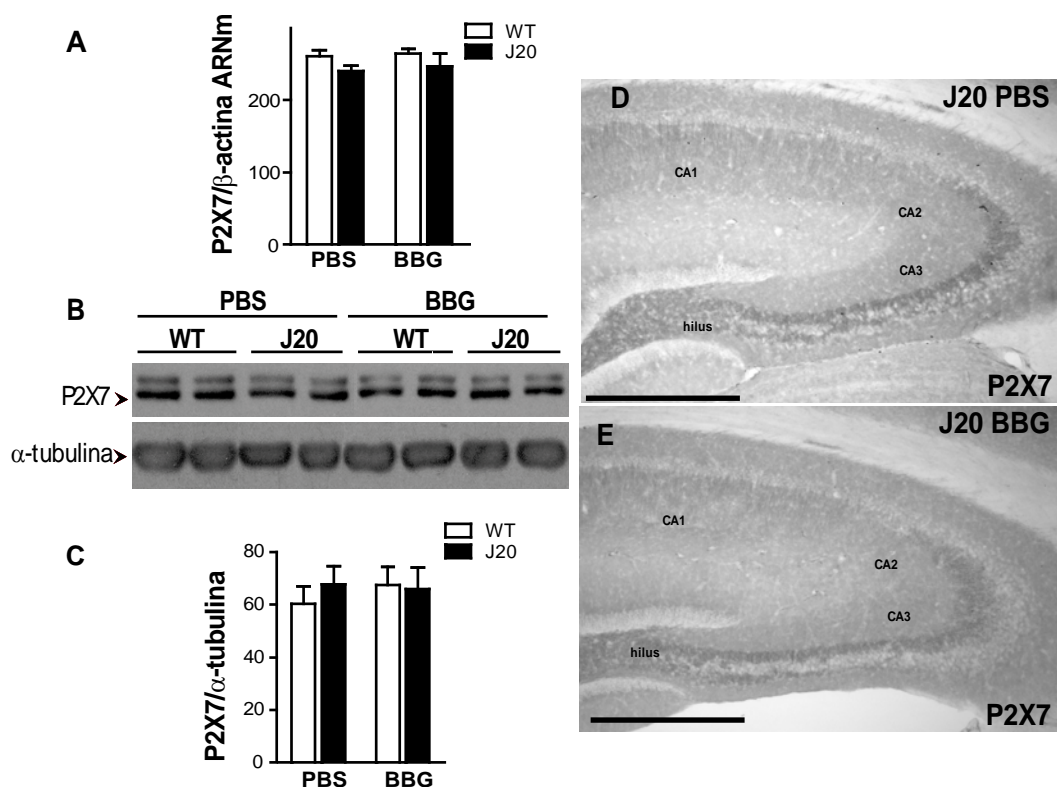
**Figura 34. El tratamiento con BBG no afecta al peso corporal de los ratones J20 o *wild type*.** Evolución de la masa corporal en ratones *wild type* (WT) o J20 durante las 16 semanas de tratamiento con tampón fosfato salino (PBS) o BBG ( $n = 7$  ratones por grupo).

De acuerdo con trabajos previos, que muestran la hipofosforilación de GSK-3 tras la infusión intracerebral de A $\beta$  (Hu *et al.*, 2009), los ratones J20 de 6-8 meses de edad también presentan una hipofosforilación constitutiva de esta enzima (el valor del cociente pGSK-3/GSK-3 total fue de  $0.4233 \pm 0.1020$  en ratones J20, frente a  $1.119 \pm 0.1618$  en ratones hermanos control; Figuras 35 A y B). Tras el tratamiento con BBG, se reevaluó el estado de fosforilación de GSK-3, revelando un bloqueo completo de la hipofosforilación constitutiva de GSK-3 que se observa en los ratones J20 tratados con vehículo (Figuras 35 A y B).



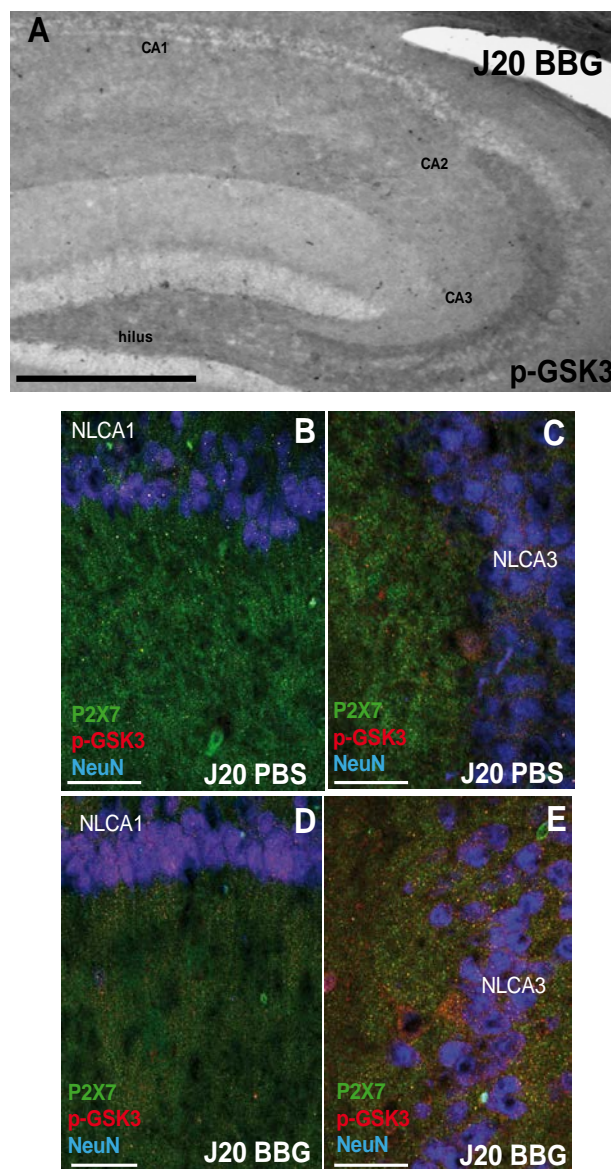
**Figura 35. El tratamiento con BBG modifica el estado de fosforilación de GSK-3 en los ratones J20.** (A) Western blot representativo de la detección de p-GSK-3 $\beta$  y GSK-3 $\beta$  total en el hipocampo de ratones *wild type* (WT) o J20 tratados con PBS o BBG. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. (B) Las barras representan la media  $\pm$  SEM del cociente p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$  total ( $n = 7$  ratones por grupo). \* $p < 0.05$ .

Sin embargo, el tratamiento con BBG no modificó significativamente los niveles de ARN mensajero (ARNm) del receptor P2X7. Asimismo, tampoco se vieron alterados, por el tratamiento con el antagonista, los niveles de la proteína P2X7, ni su patrón de distribución en el hipocampo (Figuras 36 A-E).



**Figura 36. El tratamiento con BBG no modifica la expresión de P2X7 ni su distribución en el hipocampo.** (A) Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de ARNm del receptor P2X7 en el hipocampo de ratones WT y J20 tratados con PBS o BBG ( $n = 7$  por grupo). Todos los valores fueron normalizados con respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. (B) Western blot representativo de la detección de la proteína P2X7 en el hipocampo de ratones J20 y WT tratados o no con BBG. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga (C). Las barras representan la media  $\pm$  SEM del cociente P2X7/ $\alpha$ -tubulina en el hipocampo de ratones WT y J20 tratados o no con BBG ( $n = 7$  ratones por grupo). (D y E) Inmunomarcaje del receptor P2X7 en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS (D) o BBG (E). Barra de escala, 500  $\mu$ m.

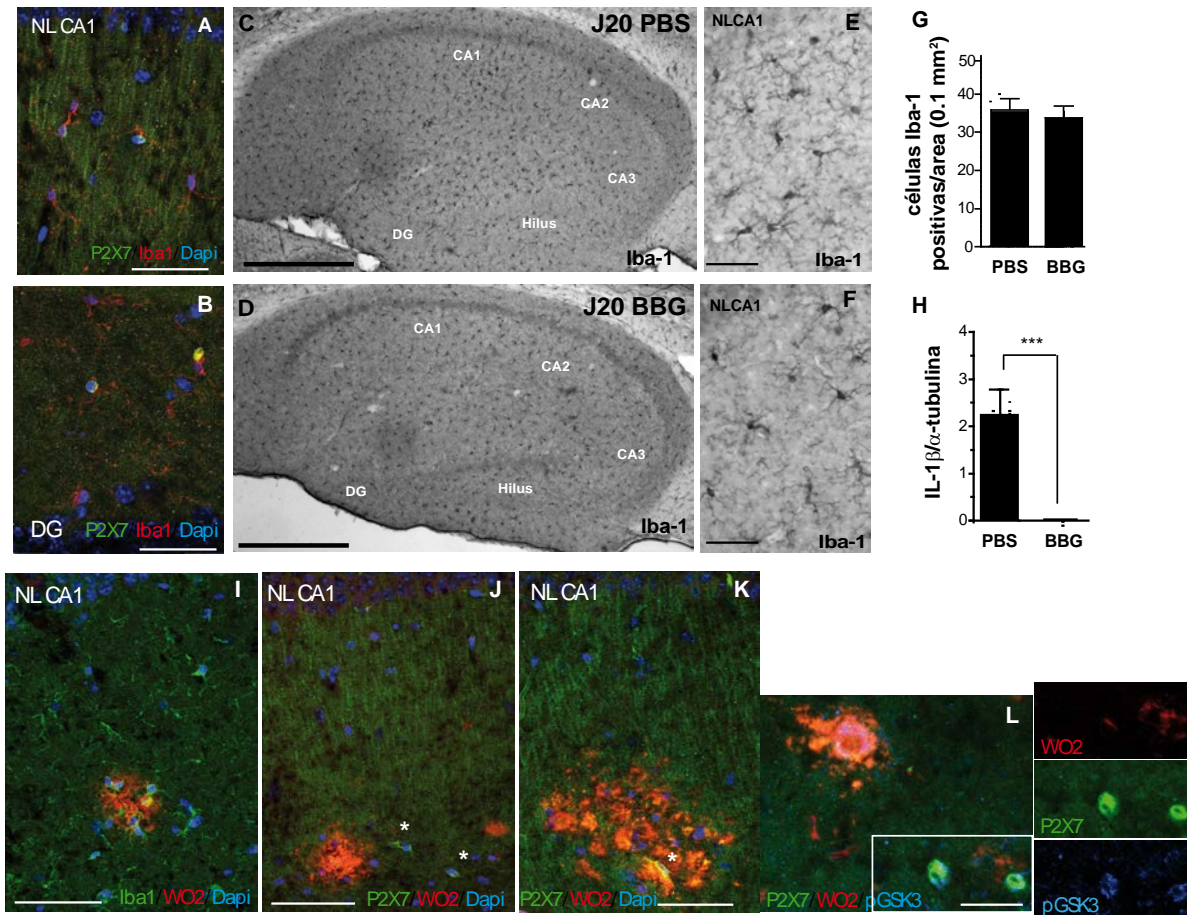
Es de destacar que cuando se analizó la distribución de la proteína GSK-3 fosforilada en el hipocampo de ratones J20 tratados con BBG (Figura 37A), se observó una gran similitud con el patrón previamente descrito para el receptor P2X7 (ver Figura 36E). De acuerdo con esto, un análisis más detallado reveló que el aumento en los niveles de p-GSK-3, inducido por BBG, tuvo lugar en el soma de neuronas piramidales CA1 y CA3 y en terminales que inervan las neuronas piramidales CA3, presentando ambas áreas inmunomarcaje positivo para el receptor P2X7 (Figuras 37 B-E).



**Figura 37. Distribución de p-GSK-3 en el hipocampo de ratones J20 tratados con BBG.** (A) Inmunomarcaje representativo de p-GSK-3 en el hipocampo de ratones J20 tratados con BBG. Barra de escala, 500  $\mu$ m. (B-E) Imágenes de microscopía confocal del hipocampo de ratones J20 tratados con PBS (B y C) o BBG (D y E) y marcados con anticuerpos frente a P2X7 (verde), p-GSK-3 (rojo) y NeuN (azul). Barra de escala, 25  $\mu$ m. Abreviaturas: NLCA1, capa nuclear CA1; NLCA3, capa nuclear CA3.

### **3.2 Efecto del tratamiento con BBG en células astrogliales y microgliales**

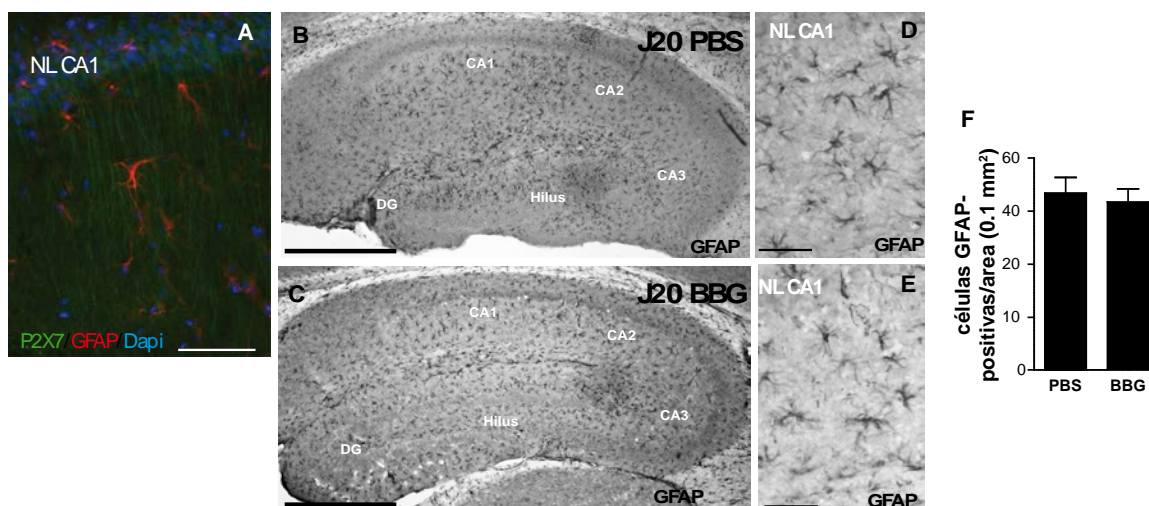
Debido a que la presencia del receptor P2X7 ha sido ampliamente descrita en células astrogliales y microgliales, decidimos comprobar si el tratamiento con BBG afectaba a estos linajes celulares. A pesar de que las células microgliales presentaron un marcaje positivo para P2X7 (Figuras 38 A y B), el tratamiento con BBG no modificó ni el número ni la morfología de estas células en el hipocampo de los ratones J20 (Figuras 38 C-G). Además, tampoco se observaron alteraciones, entre los ratones J20 tratados con BBG y sin tratar, en el reclutamiento de la microglia alrededor de las placas amiloides (Figura 38I) o en las células positivas para P2X7 que se encuentran dentro o alrededor de las placas A $\beta$  (Figuras 38 J-L). Por otra parte, en los ratones J20 tratados con BBG se detectó un descenso significativo en el marcador de inflamación IL-1 $\beta$  (Figura 38H) y un aumento en los niveles de p-GSK-3 en las células positivas para P2X7 que rodean las placas amiloides (Figura 38L), lo que es consecuente con un efecto inhibitorio del antagonista sobre el receptor P2X7 microglial.



**Figura 38. Efecto del tratamiento con BBG en células microgliales.** (A y B) Imágenes de microscopía confocal en secciones de hipocampo de ratones J20 de 6 a 8 meses de edad. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos frente a P2X7 (verde) y el marcador microglial Iba-1 (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala, 25  $\mu$ m. (C y D) Inmunomarcaje de Iba-1 en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS (C) o BBG (D). Barra de escala, 500  $\mu$ m. (E y F) Magnificación de 5 veces del área hipocampal mostrada en (C) y (D), respectivamente. Barra de escala, 50  $\mu$ m. (G) Cuantificación de las células microgliales (Iba-1-positivas) en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS o BBG. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del número de células microgliales en un área de 0.1 mm<sup>2</sup> del hipocampo. Se analizaron 16 secciones por ratón ( $n = 7$  ratones por tratamiento). (H) Cuantificación por Western blot de IL-1 $\beta$ , normalizada a  $\alpha$ -tubulina, en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS o BBG. \*\*\* $p < 0.001$ . (I) Imagen de microscopía confocal en el hipocampo de un ratón J20, marcado con anticuerpos frente a Iba-1 (verde) y WO2 (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). (J y K) Imágenes de microscopía confocal en secciones del hipocampo de ratones J20, marcadas con anticuerpos frente a P2X7 (verde) y WO2 (rojo). Se utilizó DAPI (azul) para marcar los núcleos celulares. Barra de escala, 50  $\mu$ m. (L) Imagen confocal del hipocampo, marcado con anticuerpos frente a P2X7 (verde), WO2 (rojo) y pGSK3 (azul), de un ratón J20 tratado con BBG. Barra de escala, 25  $\mu$ m. Los insertos muestran cada uno de los canales individuales del área identificada en (L). Abreviaturas: DG, giro dentado; NLCA1, capa nuclear CA1.



Por el contrario, no hemos detectado marcaje positivo para P2X7 en células astrogiales de hipocampo (Figura 39A) y, por consiguiente, tampoco se observaron modificaciones ni en el número ni en la morfología de estas células en los ratones J20 tratados con BBG, al compararlos con ratones tratados con la solución vehículo (Figuras 39B-F).

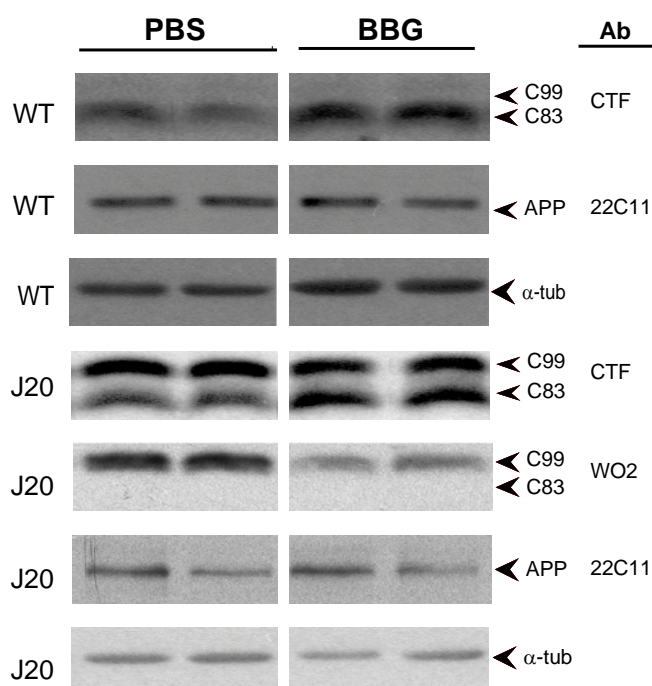


**Figura 39. Efecto del tratamiento con BBG en células astrogiales.** (A) Imagen de microscopía confocal en el hipocampo de un ratón J20, marcado con anticuerpos frente a P2X7 (verde) y el marcador astrogial GFAP (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala, 50 µm. (B y C) Inmunomarcaje de GFAP en secciones de hipocampo de ratones J20 tratados con PBS (B) o BBG (C). Barra de escala, 500 µm. (D y E). Magnificación de 5 veces del área hipocampal mostrada en (B) y (C), respectivamente. Barra de escala, 50 µm. (F) Cuantificación de las células astrogiales (GFAP-positivas) en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS o BBG. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del número de células en un área de 0.1 mm<sup>2</sup> del hipocampo. Se analizaron 16 secciones por ratón ( $n = 7$  ratones por tratamiento). Abreviaturas: DG, giro dentado; NLCA1, capa nuclear CA1.

### 3.3 El tratamiento con BBG previene el desarrollo de placas amiloides en ratones J20 mediante la regulación de la actividad $\alpha$ -secretasa.

Para determinar la influencia del receptor P2X7 en el desarrollo de las placas amiloides, el primer abordaje fue identificar los productos del procesamiento proteolítico de la APP por la  $\alpha$ -secretasa (fragmento C83) o la  $\beta$ -secretasa (fragmento C99), en el hipocampo de ratones J20 y *wild type* tratados con vehículo o con BBG. Ensayos de Western blot, empleando un anticuerpo que

reconoce la región C-terminal de la APP, permitieron identificar dos bandas, en el rango de pesos moleculares esperables para los fragmentos C-terminales (CTFs) de la APP, en el hipocampo de los ratones J20. La banda superior corresponde al fragmento generado por el procesamiento amiloidogénico de la APP por la  $\beta$ -secretasa (CTF C99), ya que esta misma banda también se detecta utilizando el anticuerpo anti-A $\beta$  WO2, el cual reconoce los aminoácidos 4-10 del péptido A $\beta$ , presentes en el fragmento C99, pero ausentes en el fragmento producto de la  $\alpha$ -secretasa, C83, de menor tamaño (banda inferior). En los ratones *wild type*, únicamente el fragmento C83 pudo ser detectado (Figura 40).

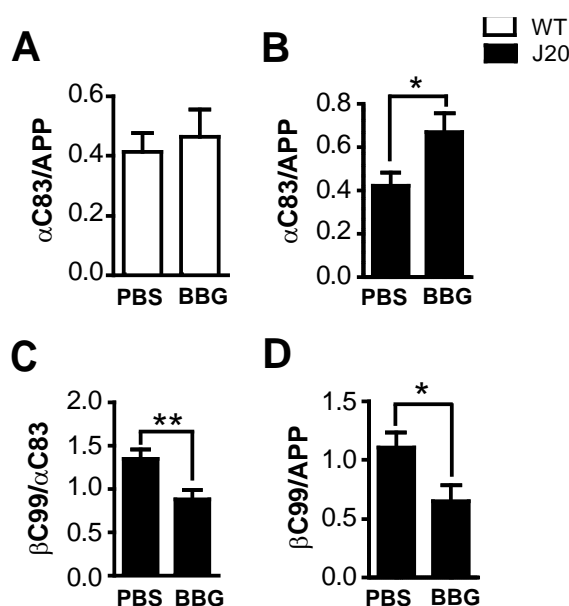


**Figura 40. Identificación de los fragmentos C-terminales de la APP, C83 y C99, en el hipocampo de ratones J20 y *wild type* tratados con PBS o BBG.** Western blot representativo de la detección de los fragmentos carboxilo-terminales de la APP, C83 y C99, y de la APP total en el hipocampo de ratones J20 y *wild type* (WT) tratados con PBS o BBG. Para dicha detección se utilizaron anticuerpos (Ab) dirigidos contra la región N-terminal de la APP (22C11), la región C-terminal de la APP (CTF) y la región N-terminal (aminoácidos 4-10) del péptido  $\beta$ -amiloide humano (WO2).  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga.

La cuantificación de estos ensayos demostró que el tratamiento con BBG aumenta significativamente el producto de la  $\alpha$ -secretasa en los ratones J20 (el cociente C83/APP fue de  $0.42 \pm 0.06$  en ratones J20 tratados con vehículo

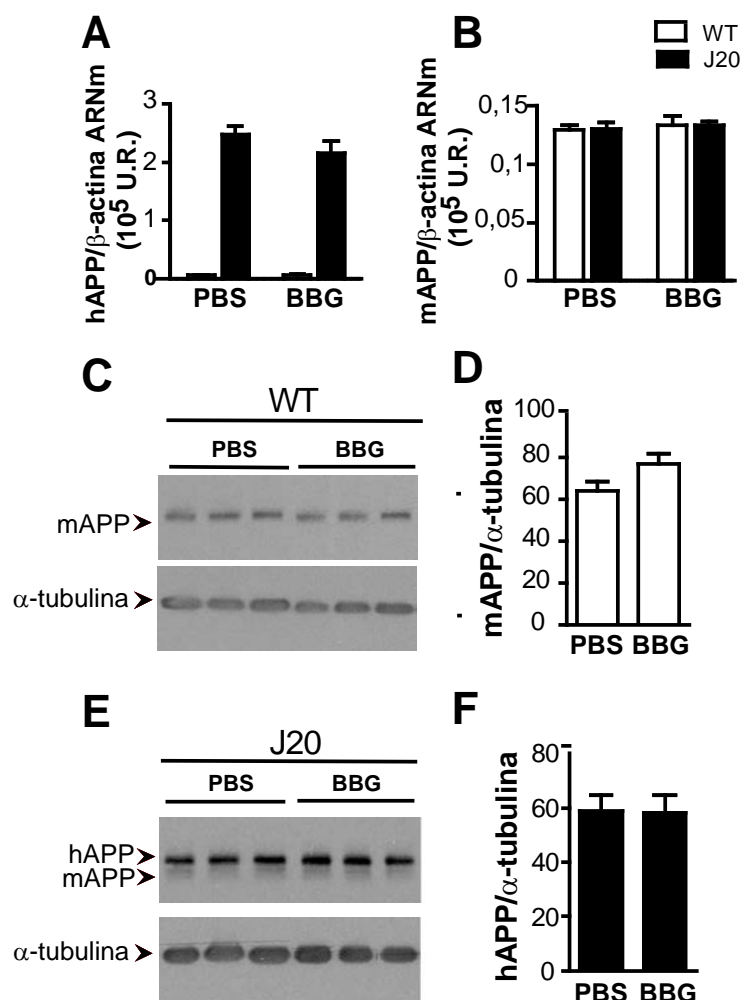


frente a  $0.67 \pm 0.08$  en ratones J20 tratados con BBG, Figura 41B). Además, en concordancia con una actividad  $\alpha$ -secretasa incrementada en los ratones J20 tratados con BBG, que conllevaría una reducción de la cantidad de sustrato (APP) disponible para la  $\beta$ -secretasa, se observó también una reducción en los niveles del fragmento C99 (cociente C99/APP de  $1.105 \pm 0.1278$  en ratones tratados con vehículo frente a  $0.6512 \pm 0.1377$  en ratones tratados con BBG, Figura 41D), detectado usando el anticuerpo WO2 específico frente a la región N-terminal del péptido A $\beta$  (residuos aminoacídicos 4-10 de A $\beta$  humano). De esta manera, el tratamiento con BBG modifica significativamente el procesamiento proteolítico de la APP en los ratones J20 (el cociente C99/C83 fue de  $1.35 \pm 0.010$  en ratones J20 tratados con vehículo, frente a  $0.88 \pm 0.010$  en ratones tratados con BBG, Figura 41C).



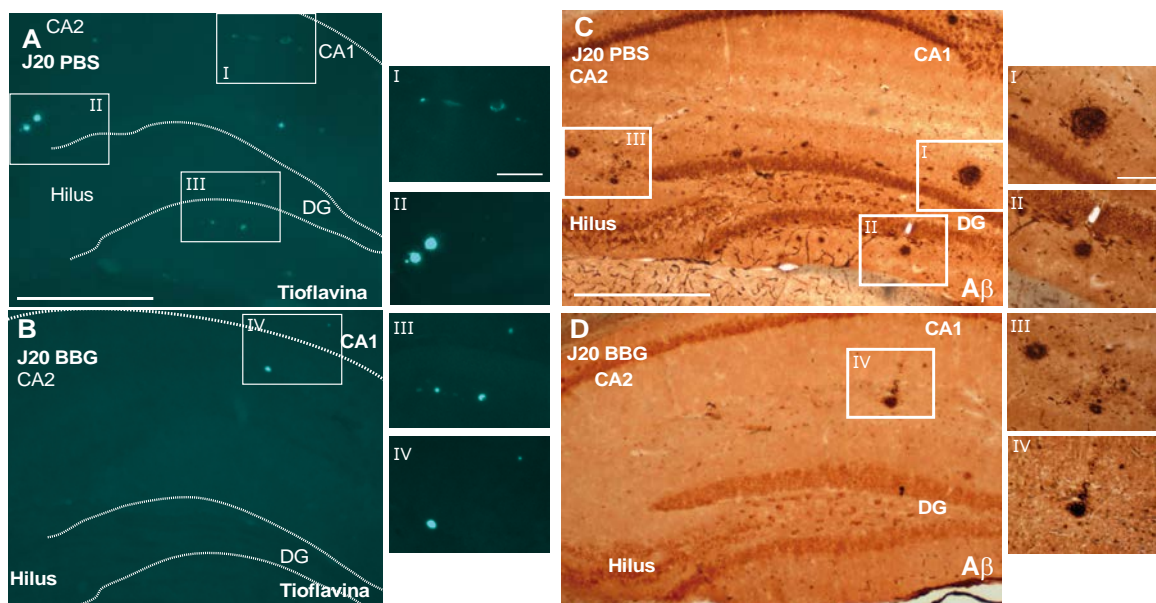
**Figura 41. El tratamiento con BBG modifica el procesamiento proteolítico de APP en los ratones J20.** (A) Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de C83, normalizados frente a la APP total, en el hipocampo de ratones *wild type* tratados con PBS o BBG ( $n = 7$  ratones por grupo). (B-D) Cuantificación de los niveles de CTF C83 (B) y CTF C99 (D), normalizados frente a la APP total, en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS o BBG ( $n = 7$  por grupo). En (C) se muestran los valores del cociente C99/C83 en los ratones J20 tratados con PBS o BBG. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.005$ .

Curiosamente, esta alteración no se vio reflejada en el ARNm (Figuras 42 A y B) ni en los niveles de proteína (Figuras 42 C-F), tanto de la proteína APP exógena humana, como de la endógena murina, que se mantuvieron sin cambios.



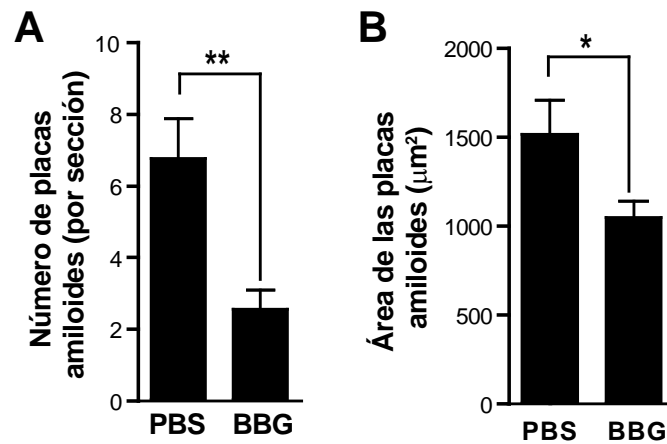
**Figura 42. El tratamiento con BBG no modifica la expresión de APP en los ratones J20 o *wild type*.** (A y B) Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de ARNm, normalizados con respecto a  $\beta$ -actina, de la APP humana (hAPP) (A) o de ratón (mAPP) (B) en el hipocampo de ratones J20 o *wild type* tratados con PBS o BBG ( $n = 7$  ratones por grupo). (C-F) Western blots e histogramas mostrando los niveles de las proteínas mAPP y hAPPm, detectadas con el anticuerpo 22C11, en el hipocampo de ratones *wild type* (C y D) o J20 (E y F) tratados con PBS o BBG ( $n = 7$  por grupo). En todos los casos se usó  $\alpha$ -tubulina como control de carga y los niveles de las proteínas mAPP y hAPP aparecen normalizados con respecto a los de  $\alpha$ -tubulina. Abreviaturas: U.R., unidades relativas.

De acuerdo con estos resultados, se observó una clara reducción en el número y el tamaño de las placas amiloides mediante análisis inmunohistoquímico del hipocampo de ratones J20 tratados con BBG (Figuras 43 A-D).



**Figura 43. El tratamiento con BBG reduce el número de placas amiloides en el hipocampo de los ratones J20.** (A y B) Tinción con tioflavina-T de las placas A $\beta$  en secciones de hipocampo de ratones J20 tratados con PBS (A) o BBG (B). Los insertos muestran la magnificación 2x de las áreas identificadas en (A) y (B). Las líneas discontinuas representan las capas nucleares del hipocampo. Barra de escala, 500  $\mu$ m (A y B) y 50  $\mu$ m (insertos). (C y D) Inmunomarcaje con el anticuerpo anti-A $\beta$  WO2 en secciones de hipocampo de ratones J20 tratados con PBS (C) o BBG (D). Barra de escala, 500  $\mu$ m. Los insertos muestran la magnificación 2x de las áreas identificadas en (C) y (D). Barra de escala, 50  $\mu$ m. Abreviaturas: DG, giro dentado.

La reducción significativa en el número de placas A $\beta$  fue confirmada mediante la cuantificación de los agregados amiloides teñidos con tioflavina-T o marcados con anticuerpos anti-A $\beta$  ( $2.55 \pm 0.54$  placas amiloides por sección en ratones J20 tratados con BBG frente a  $6.76 \pm 1.11$  en los ratones tratados con vehículo, Figura 44A). Además, se observó una reducción significativa en el tamaño de las placas amiloides restantes en el hipocampo de los ratones J20 tratados con BBG ( $1047 \pm 93.75 \mu\text{m}^2$  de superficie promedio de placa en ratones tratados con BBG frente a  $1515 \pm 193$  en ratones tratados con vehículo, Figura 44B).



**Figura 44. Cuantificación del número y tamaño de las placas amiloides en ratones J20 tratados con BBG o solución vehículo.** (A) Las barras representan la media  $\pm$  SEM del número de placas amiloides por sección en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS o BBG. (B) El histograma muestra la media  $\pm$  SEM del tamaño de las placas en el hipocampo de ratones J20 tratados con PBS o BBG. Se analizaron 16 secciones por ratón ( $n = 7$  ratones por tratamiento). \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.005$ .



## **Discusión**



En esta Tesis Doctoral se han presentado resultados que demuestran el papel de los receptores purinérgicos en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide APP, regulando la actividad de la  $\alpha$ -secretasa y por tanto el procesamiento no amiloidogénico de la APP.

Los estudios realizados en células N2a han demostrado que estas células poseen dos tipos de receptores P2, con efectos opuestos en la regulación de la actividad  $\alpha$ -secretasa. La activación del receptor P2X7 provoca una reducción en la actividad de la  $\alpha$ -secretasa, mientras que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> conduciría a un aumento en la actividad de dicho enzima.

Consecuentemente con estos resultados, la inhibición farmacológica del receptor P2X7, tanto nativo (células N2a) como expresado exógenamente (células HEK), incrementa la actividad  $\alpha$ -secretasa, aumentando de esta manera el producto del procesamiento no amiloidogénico de la APP. Efecto que parece estar mediado a través de la fosforilación, y consecuente inhibición, de la glucogéno sintasa quinasa 3 (GSK-3).

Por otro lado, en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (ratones J20), se observó que la inhibición del receptor P2X7 aumentaba la actividad  $\alpha$ -secretasa, mediante el cambio en el estado de fosforilación de GSK-3. Además, la administración *in vivo* de un antagonista P2X7 (BBG), indujo una disminución significativa en el número y tamaño de las placas amiloides que se desarrollan con la edad en el hipocampo de estos ratones.

## **1. CARACTERIZACIÓN DE DOS RECEPTORES P2 FUNCIONALES RESPONSABLES DE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\alpha$ -SECRETASA EN CÉLULAS Neuro-2a.**

La identificación y caracterización de receptores capaces de modular el procesamiento de la APP es una meta importante, que podría abrir nuevas perspectivas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (AD). Las secretasas amiloidogénicas, la  $\beta$ -secretasa (BACE1) y la  $\gamma$ -secretasa, cuya acción secuencial sobre la APP da lugar a la generación del péptido  $\beta$ -amiloide, son



dianas obvias para el tratamiento terapéutico de AD. Así, el desarrollo de inhibidores de estas enzimas, y su uso clínico, ha sido el foco de atención de numerosos trabajos de investigación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, además de tener como sustrato la APP, estas secretasas son también las responsables del procesamiento proteolítico de otras proteínas de membrana fisiológicamente relevantes, de manera que el bloqueo en la actividad de BACE1 y de la  $\gamma$ -secretasa conlleva numerosos e importantes efectos secundarios, que han restringido el uso terapéutico de los inhibidores de estas enzimas en el tratamiento de AD (Panza *et al.*, 2011; Crump *et al.*, 2013; Yan y Vassar, 2014). La modulación de la actividad de la  $\alpha$ -secretasa, promoviendo el procesamiento no amiloidogénico de la APP y la consecuente reducción de la amiloidosis cerebral, podría constituir una estrategia alternativa para el tratamiento terapéutico del Alzheimer (Bandyopadhyay *et al.*, 2007).

Ya se ha descrito anteriormente en la bibliografía que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> aumenta el procesamiento de APP dependiente de  $\alpha$ -secretasa en células de astrocitoma (Camden *et al.*, 2005). En neuronas corticales en cultivo, citoquinas inflamatorias, como la IL-1 $\beta$ , promueven la expresión funcional del receptor P2Y<sub>2</sub>, cuya activación estimula el procesamiento no amiloidogénico de la APP (Kong *et al.*, 2009). La pérdida del receptor P2Y<sub>2</sub> acelera la progresión de la enfermedad y la aparición de un fenotipo AD en un ratón transgénico (TgCRND8) modelo de Alzheimer (Ajit *et al.*, 2014). De manera similar, se ha observado una expresión reducida del receptor P2Y<sub>2</sub> en muestras post-mortem del cerebro de pacientes de AD, comparados con controles normales, lo que sugiere que la pérdida de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en humanos se correlaciona con el fenotipo AD (Lai *et al.*, 2008). Todos estos resultados han llevado a proponer un papel neuroprotector de los receptores P2Y<sub>2</sub> en la enfermedad de Alzheimer (Erb *et al.*, 2015). Nuestros resultados en las células N2a, que muestran que los agonistas del receptor P2Y<sub>2</sub> son capaces de incrementar significativamente el producto del procesamiento no amiloidogénico de la APP, confirman el efecto estimulador de los receptores P2Y<sub>2</sub> sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa y apoyan un papel putativo de estos receptores en la enfermedad de Alzheimer.

También hemos demostrado que la estimulación del receptor P2X7 conduce a una reducción en la actividad  $\alpha$ -secretasa en las células N2a. Varias líneas de evidencia demuestran que la inhibición de  $\alpha$ -secretasa inducida por BzATP depende específicamente del receptor P2X7, ya que tanto el bloqueo farmacológico de dicho receptor como la inhibición de su síntesis, mediante RNA de interferencia, previnieron completamente el efecto inhibitorio del BzATP sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa.

En un interesante trabajo, Delarasse *et al* (2011) describen un efecto opuesto del receptor P2X7 sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa, conduciendo la activación de P2X7, en este caso, a incrementos en la actividad del enzima proteolítico. Sin embargo, es relevante señalar que estos autores analizaron la modulación de la actividad  $\alpha$ -secretasa por la activación de P2X7 en células N2a que sobreexpresan la proteína APP clonada de neuroblastoma humano SHSY5Y. Por el contrario, en los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, se ha analizado el efecto del P2X7 sobre el procesamiento de la APP endógena, que se expresa de manera constitutiva en las células N2a, lo que representa una situación mucho más fisiológica. Además, en el trabajo previamente mencionado (Delarasse *et al.*, 2011) los autores estimularon las células con concentraciones elevadas de BzATP, en un rango mmol/L, por lo que no se puede descartar la implicación de otros receptores P2, como el P2Y<sub>2</sub>, que puede ser activado con altas concentraciones de BzATP (Wildman *et al.*, 2003). En este sentido cabe destacar que hemos descrito un efecto bifásico del BzATP en las células N2a, en el que a bajas concentraciones del agonista se activa un receptor P2X7 y a concentraciones elevadas resulta activado también un receptor P2Y<sub>2</sub>. En nuestro modelo, únicamente se observan efectos atribuibles a la activación selectiva de un receptor P2X7 a concentraciones de BzATP 10 veces inferiores a las empleadas por Delarasse *et al.* Además, los datos obtenidos en nuestro estudio sobre la administración *in vivo* de BBG, resultante en el desplazamiento del balance del procesamiento proteolítico del APP hacia la vía no amiloidogénica y en el descenso en el número de placas amiloides, corrobora fuertemente nuestros hallazgos en los modelos celulares. Un efecto neuroprotector del bloqueo del receptor P2X7 en la enfermedad de Alzheimer, ha sido descrito previamente en la

literatura (Ryu *et al.*, 2008). La activación de P2X7 induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios de macrófagos y microglía (Parvathenani *et al.*, 2003; Rampe *et al.*, 2004) y el efecto neuroprotector de los antagonistas del receptor P2X7 ha sido asociado con una reducción en los niveles de dichas moléculas inflamatorias. Nuestros resultados sugieren que el bloqueo del receptor P2X7 también puede resultar beneficioso al aumentar el procesamiento no-amiloidogénico de la APP, dando lugar así a una reducción en la generación del péptido A $\beta$  neurotóxico.

En resumen, este estudio proporciona la primera evidencia de que el procesamiento no amiloidogénico del APP puede ser regulado por dos receptores de nucleótidos con efectos opuestos sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa. Debido a que tanto P2X7 como P2Y<sub>2</sub> están ampliamente expresados en el cerebro, este hallazgo puede abrir nuevas y estimulantes perspectivas en el tratamiento terapéutico del Alzheimer. Por ejemplo, el tratamiento con bloqueantes del receptor P2X7 y/o activadores del receptor P2Y<sub>2</sub> podría tener efectos beneficiosos, al estimular la actividad  $\alpha$ -secretasa, favoreciendo el procesamiento no amiloidogénico de la APP y contribuyendo así a reducir los depósitos amiloides.

## **2. EL ANTAGONISMO DEL RECEPTOR P2X7 INCREMENTA LA ACTIVIDAD $\alpha$ -SECRETASA A TRAVÉS DE GSK-3.**

Respecto al receptor P2Y<sub>2</sub>, no hay, hasta la fecha, agonistas o antagonistas selectivos con buenos parámetros farmacocinéticos para su administración *in vivo*. La disponibilidad de ligandos del receptor P2X7 para estudios *in vivo* es ligeramente mejor, ya que, por ejemplo, el antagonista BBG ha demostrado ser capaz de infiltrarse en el parénquima cerebral. Se han descrito los efectos beneficiosos del tratamiento con este antagonista P2X7, que mejora la sintomatología en ratones modelo de la enfermedad de Huntington (Díaz-Hernandez *et al.*, 2009) y reduce la duración de las crisis epilépticas en ratones a los que se les indujo el estatus epiléptico mediante la administración intra-amígdala de kainato (Engel *et al.*, 2012). Recientemente, el BBG también ha

demostrado ser capaz de reducir el déficit cognitivo en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (Chen *et al.*, 2014).

A la vista de estas evidencias, decidimos analizar el efecto que el bloqueo del receptor P2X7 pudiera ejercer sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa, con vistas a una posible utilización de antagonistas de este receptor en ensayos *in vivo* de la generación de depósitos amiloides en los ratones J20 modelo de Alzheimer.

Por otra parte, diversos grupos han descrito que la inhibición farmacológica de GSK-3 disminuye la acumulación del péptido A $\beta$  tanto *in vitro* (Phiel *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2004) como *in vivo* (Su *et al.*, 2004; Rockenstein *et al.*, 2007), lo que ha estimulado la búsqueda de inhibidores potentes y selectivos de este enzima para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, los elevados niveles de la forma activa de GSK-3 detectados en los estadios iniciales en diferentes modelos de la enfermedad de Alzheimer familiar (Hernandez y Avila, 2008), espolearon esta búsqueda. Sin embargo, otros estudios han mostrado que un bloqueo sostenido de GSK-3, mediante el uso de herramientas farmacológicas (Hu *et al.*, 2009) o aproximaciones transgénicas (Gomez-Sintes *et al.*, 2007) causa disfunción motora. Una posible explicación a estos datos contradictorios podría encontrarse en el papel crítico que GSK-3 juega en la fisiología de las neuronas, apuntando a una actividad basal de GSK-3 como un requerimiento necesario para la viabilidad neuronal. De acuerdo con esta idea, se ha propuesto como nueva estrategia terapéutica el desarrollo de compuestos que modulasen negativamente, pero no aboliesen completamente, la actividad GSK-3 en las áreas del cerebro más afectadas en la enfermedad de Alzheimer (Hu, S. *et al.*, 2009).

Se ha descrito que la actividad de GSK-3 en neuronas de hipocampo, uno de los tipos celulares más afectados en la enfermedad de Alzheimer, está regulada por el receptor purinérgico P2X7 (Diaz-Hernandez *et al.*, 2008). Además, en el cerebro de pacientes de Alzheimer, se ha encontrado que las neuronas degeneradas muestran mayores niveles de calcio intracelular e incrementos en la actividad de enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes, lo que estimula la producción del péptido A $\beta$  (para una revisión ver Green y LaFerla, 2008). Estos datos resultan relevantes teniendo en cuenta que el ATP es capaz de inducir incrementos en la

concentración intracelular de calcio, la subsecuente activación de la calcio/calmodulina quinasa II y, por último, la activación de GSK-3, a través de la activación del receptor P2X7 (Leon *et al.*, 2006). A la vista de todas estas evidencias, decidimos analizar también si el efecto del receptor P2X7 sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa, pudiera estar mediado a través de la modulación de la actividad de GSK-3.

Los ensayos farmacológicos en células N2a demostraron que la actividad  $\alpha$ -secretasa se incrementaba significativamente tras el bloqueo, mediante el uso de antagonistas, del receptor P2X7, observándose en paralelo un aumento en la fosforilación de GSK-3 que conduce a una reducción en la actividad de este enzima. La inhibición directa de GSK-3, mediante el uso del inhibidor específico SB216763, incrementa el producto del procesamiento no amiloidogénico de la APP, indicando que la actividad  $\alpha$ -secretasa está modulada por GSK-3. Por otra parte, el efecto de los antagonistas del receptor P2X7 sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa está mediado a través de la fosforilación e inhibición de GSK-3, ya que dicho efecto se revierte cuando las células se transfectan con una forma mutada de este enzima que no puede ser inhibida por fosforilación.

La regulación de la actividad  $\alpha$ -secretasa mediada por el receptor P2X7, vía GSK-3, fue corroborada en células HEK transfectadas con dicho receptor.

### **3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE P2X7 SOBRE LAS PLACAS AMILOIDES EN CEREBRO.**

Dado el pronto desarrollo de placas amiloides que tiene lugar en el hipocampo y la corteza cerebral de los ratones J20, estos ratones constituyen un modelo valioso para el estudio de los eventos tempranos en la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) (Mucke *et al.*, 2000). Cuando se analiza la actividad GSK-3 por western blot, midiendo el cociente entre GSK-3 fosforilada en Ser<sup>9</sup> y los niveles totales del enzima, se observa una hipofosforilación constitutiva de GSK-3 en el hipocampo de los ratones J20, comparados con sus hermanos de camada control (*wild type*). La hipofosforilación de GSK-3 detectada en estos ratones, sugiere que GSK-3 hiperactivada puede contribuir a desencadenar eventos

tempranos en FAD. La inhibición *in vivo*, sostenida en el tiempo, del receptor P2X7, mediante el uso del antagonista BBG, previno la formación de placas amiloides en el hipocampo de los ratones J20. El incremento en los niveles de GSK-3 fosforilada, observado en neuronas piramidales CA1 y CA3 y en terminales que inervan las neuronas piramidales CA3, junto con la producción aumentada del fragmento no amiloidogénico de la APP, en los ratones J20 tratados con BBG, confirman que la administración *in vivo* de un inhibidor de P2X7 potencia la actividad  $\alpha$ -secretasa a través de GSK-3. Finalmente, el hecho de que la inhibición del receptor P2X7 favorece la producción del fragmento no-amiloidogénico de la APP, indica que la reducción en el número y tamaño de las placas A $\beta$  por el tratamiento con BBG no se debe a la acción directa de este compuesto sobre las fibras amiloides, como ha sido descrito anteriormente para el colorante rojo Congo (Lorenzo y Yankner, 1994; Sánchez *et al.*, 2003).

La acumulación de células de microglía alrededor de las placas amiloides (Christie *et al.*, 1996; Stalder *et al.*, 1999) y la expresión incrementada de mediadores inflamatorios en la enfermedad de Alzheimer (McGeer and McGeer, 1996), ha sido ampliamente descrita en la bibliografía. Trabajos más recientes sugieren también que GSK-3 puede actuar como un mediador crucial en las acciones inflamatorias de la microglia (Yuskaitis and Jope, 2009). Estudios realizados en un modelo de ratón de FAD indican que, en estadios avanzados de la enfermedad, la expresión del receptor P2X7 se encuentra específicamente aumentada en la microglía que rodea las placas amiloides (Parvathenani *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha visto que el aumento en la expresión del receptor P2X7 en microglía es dependiente de la edad y va en paralelo con el desarrollo de placas A $\beta$  (Lee *et al.*, 2011). Asimismo, otros autores han descrito que el ATP liberado tras la administración intrahipocampal aguda de A $\beta$  induce la activación microglial, actuando a través del receptor P2X7 (Sanz *et al.*, 2009). Además, tanto la expresión aumentada de receptores P2X7, como la gliosis y las filtraciones en la barrera hemato-encefálica, inducidas por la inyección directa de A $\beta$ 42 en el hipocampo de ratas, se previenen mediante el pretratamiento con BBG (Ryu and McLarnon, 2008). Teniendo en cuenta todas estas observaciones, consideramos

la posibilidad de que los efectos beneficiosos del tratamiento con BBG en los ratones J20 pudiesen ser debidos, al menos en parte, a una atenuación de la gliosis y la respuesta inflamatoria (Takenouchi *et al.*, 2010). Si bien el tratamiento con BBG disminuye la liberación de IL-1 $\beta$  en el hipocampo de los ratones J20, no hay evidencias de un efecto beneficioso de este agonista que pueda ser atribuible a una reducción de los eventos inflamatorios. A los 6-8 meses de edad los modelos de ratón de FAD no muestran un componente neuroinflamatorio severo e incluso en la fase pre-placa, que es precisamente en el momento en el que comenzamos nuestro tratamiento, las células microgliales sólo muestran una morfología activada intermedia (Ferretti *et al.*, 2011). En concordancia con esta hipótesis, el bloqueo del receptor P2X7 no produjo cambios ni en el número de células microgliales, ni en su morfología celular, en el hipocampo de los ratones J20 tratados con BBG.

Los datos aquí presentados demuestran por primera vez que la inhibición *in vivo* del receptor P2X7 reduce significativamente la formación de placas amiloides en un modelo de ratón de FAD mediante un mecanismo dependiente de la actividad de  $\alpha$ -secretasa y GSK-3. Además, los efectos eficientes y aparentemente no tóxicos de un tratamiento prolongado con BBG sugieren que la inhibición del receptor P2X7 podría constituir un enfoque terapéutico apropiado para prevenir los depósitos de amiloide en FAD, previniendo, de esta manera, la progresión de la enfermedad.

# **Conclusiones**





1. La estimulación de las células N2a con el agonista purinérgico BzATP produce un efecto bifásico sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa. Bajas concentraciones de BzATP inhiben la actividad  $\alpha$ -secretasa en estas células, mientras que concentraciones más elevadas del agonista incrementan la actividad del enzima. Estudios farmacológicos han mostrado que ambos efectos están mediados a través de receptores diferentes.
2. Las células N2a expresan receptores P2Y<sub>2</sub>, cuya activación con el agonista específico Up<sub>4</sub>U estimula la actividad  $\alpha$ -secretasa. El incremento de la actividad  $\alpha$ -secretasa inducido por BzATP muestra un perfil de inhibición que es compatible con la activación de un receptor P2Y<sub>2</sub>.
3. El efecto inhibitorio del BzATP sobre la actividad  $\alpha$ -secretasa está mediado por un receptor P2X<sub>7</sub>, ya que tanto el bloqueo farmacológico, como la reducción de la expresión de dicho receptor, previenen este efecto.
4. La inhibición farmacológica del receptor P2X<sub>7</sub> induce un incremento en la actividad  $\alpha$ -secretasa en las células N2a, favoreciendo así el procesamiento no amiloidogénico de la APP. Este efecto está mediado a través de la fosforilación e inhibición de GSK-3.  
  
La regulación de la actividad  $\alpha$ -secretasa por el receptor P2X<sub>7</sub>, vía GSK-3, fue corroborada en células HEK en las que se expresó heterológamente este receptor.
5. La administración *in vivo* del antagonista selectivo del receptor P2X<sub>7</sub>, BBG, induce la fosforilación de GSK3 y previene la formación de placas amiloides en el hipocampo de los ratones J20, mediante el incremento de la actividad  $\alpha$ -secretasa.



# **Bibliografía**



## Bibliografia

- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G** (2003): Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24:52-55.
- Abbracchio MP, Burnstock G** (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64:445-475.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA** (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58:281-341.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H** (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences* 32:19-29.
- Aga M, Johnson CJ, Hart AP, Guadarrama AG, Suresh M, Svaren J, Bertics PJ, Darien BJ** (2002) Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X<sub>7</sub>. *J Leukoc Biol* 72:222-232.
- Ahn K, Shelton CC, Tian Y, Zhang X, Gilchrist ML, Sisodia SS, Li YM** (2010). Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(50):21435-40.
- Ajit, D., Woods, L.T., Camden, J.M., Thebeau, C.N., El-Sayed, F.G., Greeson, G.W., et al.** (2014). Loss of P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 49, 1031–1042.
- Alloisio S, Cervetto C, Passalacqua M, Barbieri R, Maura G, Nobile M, Marcoli M** (2008) Functional evidence for presynaptic P2X<sub>7</sub> receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett* 582:3948-3953.
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, az-Nido J** (1999). Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* 453:260–264.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P** (2003): Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem.* 86(3):582-90.
- Andreev, J., Galisteo, M. L., Kranenburg, O., Logan, S. K., Chiu, E. S., Okigaki, M., Cary, L. A., Moolenaar, W. H. and Schlessinger, J.** (2001). Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-

- activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 276, 20130-20135
- Aplin A. E., Gibb G. M., Jacobsen J. S., Gallo J. M., Anderton B. H.** (1996). In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *J. Neurochem.* 67, 699–70710.1046/j.1471-4159.1996.67020699
- Apolloni, S.; Montilli, C.; Finocchi, P.; Amadio S** (2009). Membrane compartments and purinergic signalling: P2X receptors in neurodegenerative and neuroinflammatory events. *FEBS J.* 276, 354–364.
- Aschrafi A., Sadtler S., Niculescu C., Rettinger J., Schmalzing G.** (2004). Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J. Mol. Biol.* 342, 333–343
- Atkinson L, Batten TF, Moores TS, Varoqui H, Erickson JD, Deuchars J.** (2004) Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience.* 123(3):761-8.
- Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG** (2002): Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110:55-67.
- Bagchi S, Liao Z, Gonzalez FA, Chorna NE, Seye CI, Weisman GA, Erb L.** (2005) The P2Y2 nucleotide receptor interacts with  $\alpha$ v integrins to activate Go and induce cell migration. *J. Biol. Chem.* 280:39050–39057.
- Bahima L, Aleu J, Elias M, Martin-Satue M, Muhaisen A, Blasi J, Marsal J, Solsona C** (2006) Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 206:95-102.
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA** (2002). Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 30;531(1):2-6.
- Baltensperger K., Porzig H** (1997). The P2U purinoceptor obligatorily engages the heterotrimeric G protein G16 to mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> in human erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 272:10151–10159.
- Bandyopadhyay, S., Goldstein, L.E., Lahiri, D.K. y Rogers, J.T. (2007).** Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 14, 2848-2864.
- Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM** (2005). AFM imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers, but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem.* 280:10759–10765
- Barth K, Weinhold K, Guenther A, Young MT, Schnittler H, Kasper M** (2007) Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells. *FEBS J* 274:3021-3033.

- Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F** (2008) The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J Biol Chem* 283:25725-25734.
- Behr D et al.: Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I.** *J Biol Chem* 1996, 271:1613-1620. [SEP]
- Behr D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G** (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem*. Jan 19;271(3):1613-20
- Beigi RD, Kertesz SB, Aquilina G, Dubyak GR** (2003) Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br J Pharmacol* 140:507-519.
- Bell KF, Zheng L, Fahrenholz F, Cuellar AC** (2008). ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging*. Apr;29(4):554-65.
- Benjamin WB, Pentylala SN, Woodgett JR, Hod Y, Marshak D** (1994). ATP citrate-lyase and glycogen synthase kinase-3 beta in 3T3-L1 cells during differentiation into adipocytes. *Biochem J*. Jun 1;300 ( Pt 2):477-82.
- Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M, Vassar R** (2000b): Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem*, 275:20647-20651.
- Bennett BD, Denis P, Haniu M, Teplow DB, Kahn S, Louis JC, Citron M, Vassar R** (2000a): A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta-secretase. *J Biol Chem*, 275:37712-37717. [SEP]
- Berti-Mattera LN, Wilkins PL, Madhun Z, Suchovsky D** (1996) P2-purigenic receptors regulate phospholipase C and adenylate cyclase activities in immortalized Schwann cells. *Biochem. J*. 314(2), 555–561.
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J** (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem*. 89(6):1313-7.
- Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T** (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376:127-138.
- Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Seigny J** (2004). Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*. 43:5511–5519.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, [SEP]Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, et al** (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385:729-733.
- Blacker M, Noe MC, Carty TJ, Goodyer CG, LeBlanc AC** (2002): Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease



- inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons. *J Neurochem*, 83:1349-1357.
- Bo X, Jiang LH, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A, et al** (2003). Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol.* ;63:1407–1416.
- Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD** (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22:4814-4824.
- Bodin P, Burnstock G** (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, et al** (1996): Familial Alzheimer's disease- linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 17:1005-1013.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A** (2010): Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production. *J Neurosci*, 30:15927-15942.
- Boué-Grabot E, Akimenko MA, Séguéla P** (2000). Unique functional properties of a sensory neuronal P2X ATP-gated channel from zebrafish. *J Neurochem*. Oct;75(4):1600-7.
- Bowler W.bB, Birch M.A., Gallagher J.aA, Bilbe G** (1995). Identification and cloning of human P2upurinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J. Bone Min. Res.* ;10:1137–1145.
- Bredesen DE** (2009): Neurodegeneration in Alzheimer's disease: caspases and synaptic element interdependence. *Mol Neurodegener*, 4:27. [SEP]
- Buée, L., Bussiére, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R.** (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 95–130.
- Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, Antonarakis SE** (1998) Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels* 5:347-354.
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray DC, Dermietzel R** (2000) Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3201-3206.
- Buisman HP, Steinberg TH, Fischbarg J, Silverstein SC, Vogelzang SA, Ince C, Ypey DL, Leijh PC** (1988) Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7988-7992.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C** (1992): Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 1992, 267:546-554. [SEP]

- Burnstock G** (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36:1127-1139.
- Burnstock G** (2007a) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659-797.
- Burnstock G** (2007b) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64:1471-1483.
- Burnstock G** (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7:575-590.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A** (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40:668-688.
- Burnstock G, Dumsday B, Smythe A** (1972) Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol* 44:451-461.
- Burnstock G, Knight GE** (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31-304.
- Burnstock G** (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L, editors. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. New York: Raven Press; 1978. pp. 107-118.
- Burrell H.E., Bowler W.B., Gallagher J.A., Sharpe G.R.** (2003) Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors. *J. Invest. Dermatol.* 20:440-447.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA** (1998): Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*, 273:27765-27767.
- Cabrini G, Falzoni S, Forchap SL, Pellegatti P, Balboni A, Agostini P, Cuneo A, Castoldi G, Baricordi OR, Di Virgilio F** (2005) A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol* 175:82-89.
- Caceres J, Brandan E** (1997): Interaction between Alzheimer's disease beta A4 precursor protein (APP) and the extracellular matrix: evidence for the participation of heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biochem*, 65:145-158.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC** (2001): <sup>[L]</sup><sub>SEP</sub>BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by <sup>[L]</sup><sub>SEP</sub>neurons. *Nat Neurosci*, 4:233-234. <sup>[L]</sup><sub>SEP</sub>
- Camden, J.M.; Schrader, A.M.; Camden, R.E.; González, F.A.; Erb, L.; Seye, C.I.; Weisman, G.A.** (2005) P2Y2 nucleotide receptors enhance  $\alpha$ -

- secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J. Biol. Chem.*, 280, 18696–18702.
- Caporaso GL, Takei K, Gandy SE, Matteoli M, Mundigl O, Greengard P, De Camilli P** (1994): Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 14:3122-3138.
- Carrasquero LM, Delicado EG, Bustillo D, Gutierrez-Martin Y, Artalejo AR, Miras-Portugal MT** (2009) P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem* 110:879-889.
- Carrasquero LM, Delicado EG, Sanchez-Ruiloba L, Iglesias T, Miras-Portugal MT** (2010) Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes. *Glia*. Jun;58(8):984-95.
- Chambers LJ, Stevens AJ, Moses AP, Michel AD, Walter DS, Davies DJ, Livermore DG, Fonfria E, Demont EH, Vimal M, Theobald PJ, Beswick PJ, Gleave RJ, Roman SA, Senger S** (2010) Synthesis and structure-activity relationships of a series of (1H-pyrazol-4-yl)acetamide antagonists of the P2X(7) receptor. *Bioorg Med Chem Lett*. 20(10):3161-4
- Charlton S.J., Brown C.A., Weisman G.A., Turner J.T, Erb L., Boarder M.R..** (1996) Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br. J. Pharmacol.* 119:1301–1303.
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F** (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279:29628-29638.
- Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC, Greenfeder S** (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332:17-27.
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN** (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377:428-431.
- Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, Kawai T, Bohm C, Katayama T, et al** (2006). TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature*. Apr 27;440(7088):1208-12.
- Chen X, Pierce B, Naing W, Grapperhaus ML, Phillion** (2010) Discovery of 2-chloro-N-((4,4-difluoro-1-hydroxycyclohexyl)methyl)-5-(5-fluoropyrimidin -2-yl)benzamide as a potent and CNS penetrable P2X(7) receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 15;20(10):3107-11.
- Chen X., Hu J., Jiang L., Xu S., Zheng B., Wang C., et al.** (2014). Brilliant Blue G improves cognition in an animal model of Alzheimer's disease and inhibits amyloid-beta-induced loss of filopodia and dendrite spines in hippocampal neurons. *Neuroscience* 279, 94–101.

- Chen Z-P., Krull N., Xu S., Levy A., Lightman S.L.** (1996) Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled adenosine triphosphate (ATP) receptor. *Endocrinology*. 137:1833–1840.
- Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN** (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114:386-396.
- Chorna NE, Santiago-Perez LI, Erb L, Seye CI, Neary JT, Sun GY, Weisman GA, Gonzalez FA.** (2004) P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J. Neurochem*. 91:119–132.
- Christie, R.H., Freeman, M., Hyman, B.T.,** (1996.) Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 148, 399–403.
- Clarke L.L., Harline M.C., Otero M.A., Glover G.G., Garrad R.C., Krugh B., Walker N.M., Gonzalez F.A., Turner J.T., Weisman G.A** (1999). Desensitization of P2Y2 receptor-activated transepithelial anion secretion. *Am. J. Physiol.* 276:C777–C787.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W.** (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116: 207-225.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M** (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56:2-5.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G** (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1277-1283.
- Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, and Boeynaems JM** (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to Gi . *J Biol Chem* 276:41479–41485.
- Creemers JW, Ines Dominguez D, Plets E, Serneels L, Taylor NA, Multhaup G, [SEP] Craessaerts K, Annaert W, De Strooper B** (2001): Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem*, 276:4211-4217.
- Crump, C.J., Johnson, D.S. y Li, Y.M.** (2013). Development and mechanism of gamma-secretase modulators for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 52, 3197-3216.
- Cupers P, Bentahir M, Craessaerts K, Orlans I, Vanderstichele H, Saftig P, De Strooper B, Annaert W** (2001): The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol*, 154:731-740.

- Dave RH, Saengsawang W, Yu JZ, Donati R, Rasenick MM.** (2009) Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes. *Neurosignals*;17(1):100-8.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, et al** (1999): Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 90:1-13. [L]  
[SEP]
- De Ferrari GV, Chacón MA, Barría MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G, Reyes AE, Alvarez A, Bronfman M, Inestrosa NC. A** (2003) Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils. *Mol Psychiatry*. 8(2):195-208.
- Deacon, R.M., Cholerton, L.L., Talbot, K., Nair-Roberts, R.G., Sanderson, D.J., Romberg, C., Koros, E., Bornemann, K.D., Rawlins, J.N.,.** (2008) Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. *Behav. Brain Res*. 189, 126–138.
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. and Kanellopoulos, J.M.** (2011) The purinergic receptor P2X7 triggers a-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem*. 286, 2596–2606.
- Delicado EG, Jimenez AI, Carrasquero LM, Castro E, Miras-Portugal MT** (2005) Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes. *J Neurosci Res* 81:789-796.
- Denlinger LC, Coursin DB, Schell K, Angelini G, Green DN, Guadarrama AG, Halsey J, Prabhu U, Hogan KJ, Bertics PJ** (2006) Human P2X7 pore function predicts allele linkage disequilibrium. *Clin Chem* 52:995-1004.
- Denlinger LC, Sommer JA, Parker K, Gudipaty L, Fisette PL, Watters JW, Proctor RA, Dubyak GR, Bertics PJ** (2003) Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol* 171:1304-1311.
- DePaoli-Roach AA.** (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem*. 259(19):12144-52.
- Di Virgilio F** (1995) The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16:524-528.
- Di Virgilio F** (2003) Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol* 140:441-443.
- Di Virgilio F** (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28:465-472.

- Díaz-Hernandez M, del Puerto A, Díaz-Hernandez JI, Díez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT** (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 121:3717-3728.
- Díaz-Hernández M, Díez-Zaera M, Sánchez-Nogueiro J, Gómez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ.** (2009) Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* 23(6):1893-906.
- Díaz-Hernandez M, Pereira MF, Pintor J, Cunha RA, Ribeiro JA, Miras-Portugal MT** (2002b) Modulation of the rat hippocampal dinucleotide receptor by adenosine receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 301:441-450.
- Díaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT** (2001) Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur J Neurosci* 14:918-926.
- Díaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT** (2002a) Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology* 42:20-33.
- Díaz-Hernandez M, Pintor J, Miras-Portugal MT** (2000) Modulation of the dinucleotide receptor present in rat midbrain synaptosomes by adenosine and ATP. *Br J Pharmacol* 130:434-440.
- Díaz-Hernandez M, Sanchez-Nogueiro J, Miras-Portugal MT** (2006) Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Mol Neurosci* 30:177-180.
- Díaz-Hernandez M, Sanchez-Nogueiro J, Pintor J, Miras-Portugal MT** (2004a) Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 311:954-967.
- Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C.** (2013) Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci.* 7:49.
- Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B.** (2005) Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem.* 280(35):30797-806.
- Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camachol, E., Marjaux, E., Craessaerts, K., et al.** (2005) Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem.* 280(35):30797-806
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF** (2004) Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1053-1061.

- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C** (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 486-488. [SEP]
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D** (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359:144-147.
- Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS** (2002) Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* 120:119-131.
- Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Kuper N, Karcher C, Weissmuller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, Colgan SP** (2006) ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99:1100-1108.
- Embi N, Rylatt DB, Cohen P.** (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* 07:519-527.
- Engel T, Hernández F, Avila J, Lucas JJ.** (2006) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci.* 26(19):5083-90.
- Engel, T., Gomez-Villafuertes, R., Tanaka, K., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Garcia-Huerta, P., et al.** (2012). Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J* 26, 1616-1628.
- Ennion SJ, Evans RJ** (2002) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol* 61:303-311.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA** (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452:552-562.
- Erb L, Liu J, Ockerhausen J, Kong Q, Garrad RC, Griffin K, Neal C, Krugh B, Santiago-Perez LI, Gonzalez FA, et al.** (2001) An RGD sequence in the P2Y2 receptor interacts with  $\alpha\beta3$  integrins and is required for G $\alpha$ -mediated signal transduction. *J. Cell Biol.* 53:491-501.
- Erb L., Lustig, K. D., Sullivan, D. M., Turner, J. T., & Weisman, G. A.** (1993) Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2U purinergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*;90(22):10449-53.
- Erb, L., Cao, C., Ajit, D. y Weisman, G.A.** (2015). P2Y receptors in Alzheimer's disease. *Biol Cell* 107, 1-21.
- Erb, L., Garrad, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J.T. and Weisman G.A.** (1995) Site-directed mutagenesis of Ptu purinoceptors: Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J. Biol. Chem.*, 270: 4185-4188.
- Espana J, Gimenez-Llort L, Valero J, Minano A, Rabano A, Rodriguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA** (2010): Intraneuronal beta-amyloid

- accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry*, 67:513-521. [SEP]
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A** (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48:178-183.
- Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr, Woodgett JR, Mills GB.** (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:11960–11965.
- Fath T, Eidenmuller J, Brandt R.** (2002) Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 22:9733–9741
- Feng YH, Li X, Wang L, Zhou L, Gorodeski GI** (2006) A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* 281:17228-17237.
- Feng YH, Wang L, Wang Q, Li X, Zeng R, Gorodeski GI** (2005) ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and beta-arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1342-1356.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F** (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176:3877-3883.
- Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K** (1997a) Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *The Journal of cell biology* 139:1635-1643.
- Ferretti, M.T., Bruno, M.A., Ducatzenzeiler, A., Klein, W.L., Cuello, A.C.,** (2011). Intracellular Abeta-oligomers and early inflammation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*.
- Fiol CJ, Haseman JH, Wang YH, Roach PJ, Roeske RW, Kowalczyk M, DePaoli-Roach AA.** (1988) Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase-3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1. *Arch Biochem Biophys*. 267:797–802.
- Fiol CJ, Mahrenholz AM, Wang Y, Roeske RW, Roach PJ.** (1987) Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem*. 262:14042–14048.
- Fischer W, Krugel U** (2007) P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem* 14:2429-2455.
- Frame S, Cohen P, Biondi RM.**(2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell*. :1321–1327.



- Frame S, Cohen P.** (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 359:1–16.
- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, et al** (2002): aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3:85-97.
- Franke H, Krügel U, Illes P** (1999) P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 28:190–200.
- Franke H, Verkhratsky A, Burnstock G, Illes P.** (2012) Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal.* (3):629-57.
- Franke, H.** (2011) Role of G protein-coupled receptors (GPCRs) for purines and pyrimidines in mediating degeneration and regeneration under neuroinflammatory processes. *Purinergic Signal.* 2011, 7, 1–5.
- Franke, H.; Verkhratsky, A.; Burnstock, G.; Illes, P.** (2012) Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal.* 8, 629–657.
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J** (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-552.
- Friedrich RP, Tepper K, Ronicke R, Soom M, Westermann M, Reymann K, Kaether C, Fandrich M** (2010): Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:1942-1947.
- Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP** (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43:218-203.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP** (1996): Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67:1882-1896.
- Galvan V, Gorostiza OF, Banwait S, Ataie M, Logvinova AV, Sitaraman S, Carlson E, Sagi SA, Chevallier N, Jin K, et al** (2006): Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:7130-7135.
- Garcia A, Shankar H, Murugappan S, Kim S, Kunapuli SP** (2007) Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *Biochem J* 404:299-308.
- Gargett CE, Wiley JS** (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 120:1483-1490.
- Garrad RC, Otero MA, Erb L, Theiss PM, Clarke LL, Gonzalez FA, Turner JT, Weisman GA.** (1998) Structural basis of agonist-induced desensitization

- and sequestration of the P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor. Consequences of truncation of the C terminus. *J Biol Chem.* 273(45):29437-44.
- Gendron FP, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA** (2003) Mechanisms of P2X<sub>7</sub> receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C571-581.
- Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, et al** (1999): Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97:395-406. [L]  
[SEP]
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP** (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 452:513-537.
- Giliberto L, Zhou D, Weldon R, Tamagno E, De Luca P, Tabaton M, D'Adamio L** (2008): Evidence that the Amyloid beta Precursor Protein- intracellular domain lowers the stress threshold of neurons and has a "regulated" transcriptional role. *Mol Neurodegener*, 3:12.
- Goding JW, Grobбен B, Slegers H** (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638:1-19.
- Goedert M, Jakes R.** (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with tau patten in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*; 9:4225-4230.
- Gomez-Sintes, R., Hernandez, F., Bortolozzi, A., Artigas, F., Avila, J., Zaratin, P. et al.** (2007). Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *EMBO J* 26, 2743-2754.
- Gomez-Villafuertes R, del Puerto A, Diaz-Hernandez M, Bustillo D, Diaz-Hernandez JI, Huerta PG, Artalejo AR, Garrido JJ, Miras-Portugal MT** (2009) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X<sub>7</sub> receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Febs J* 276:5307-5325.
- Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem* 77:84-93.
- Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2003) GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology* 44:311-323.
- Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2004) GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1148-1157.
- Gonnord P, Delarasse C, Auger R, Benihoud K, Prigent M, Cuif MH, Lamaze C, Kanellopoulos JM** (2009) Palmitoylation of the P2X<sub>7</sub> receptor, an ATP-

- gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J* 23:795-805.
- Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E** (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460:599-604.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, et al** (2000): Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol*, 156:15-20. [SEP]
- Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR** (2002): APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:775-779. [SEP]
- Green, K.N. y LaFerla, F.M.** (2008). Linking calcium to Ab and Alzheimer's disease. *Neuron* 59, 190-194.
- Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H** (1999): Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:742-747.
- Greig AV, James SE, McGrouther DA, Terenghi G, Burnstock G.** (2003a) Purinergic receptor expression in the regeneration epidermis in a rat model of normal and delayed wound healing. *Exp Dermatol*. 12(6):860-71.
- Greig AV, Linge C, Terenghi G, McGrouther DA, Burnstock G.** (2003b) Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*;120(6):1007-15.
- Griffin W. S., Sheng J. G., Royston M. C., Gentleman S. M., McKenzie J. E., Graham D. I., Roberts G. W. and Mrak R. E.** (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland) 8, 65-72.
- Grimes CA, Jope RS** (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78:1219-1232.
- Gross, E.,**(1961) On induction of sarcomas with specially purified triphenylmethane dyes, Light Green SF and Patent Blue AE, following repeated subcutaneous injection in rats [in German]. *Z. Krebsforsch.* 64, 287-304.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.** (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260(6):3440-50.
- Gu BJ, Rathsam C, Stokes L, McGeachie AB, Wiley JS** (2009) Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C430-439.
- Gu BJ, Sluyter R, Skarratt KK, Shemon AN, Dao-Ung LP, Fuller SJ, Barden JA, Clarke AL, Petrou S, Wiley JS** (2004) An Arg307 to Gln polymorphism

- within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 279:31287-31295.
- Gu BJ, Zhang W, Worthington RA, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, Barden JA, Wiley JS** (2001) A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 276:11135-11142.
- Gu Y, Sanjo N, Glista M, Rogaeva E, et al** (2006): TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature*, 440:1208-1212.
- Gualix J, Fideu MD, Pintor J, Rotllan P, Garcia-Carmona F, Miras-Portugal MT** (1997) Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *Faseb J* 11:981-990.
- Gualix J, Gomez-Villafuertes R, Diaz-Hernandez M, Miras-Portugal MT** (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem* 87:160-171.
- Gualix J, Pintor J, Miras-Portugal MT** (1999) Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* 73:1098-1104.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD** (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72:1447-1456.
- Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC** (2001) Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, 125:489-492. [11 SEP]
- Haass C, De Strooper B** (1999): The presenilins in Alzheimer's disease—proteolysis holds the key. *Science*, 286:916-919.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ** (1993): beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*, 268:3021-3024.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al** (1992): Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359:322-325.
- Haines WR, Migita K, Cox JA, Egan TM, Voigt MM** (2001) The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *J Biol Chem* 276:32793-32798.
- Han P, Dou F, Li F, Zhang X, Zhang YW, Zheng H, Lipton SA, Xu H, Liao FF** (2005): Suppression of cyclin-dependent kinase 5 activation by amyloid precursor protein: a novel excitoprotective mechanism involving modulation of tau phosphorylation. *J Neurosci*, 25:11542-11552.
- Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, et al** (1997): Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med*, 3:1016-1020.

- He G, Luo W, Li P, Remmers C, Netzer WJ, Hendrick J, Bettayeb K, Flajolet M, Gorelick F, Wennogle LP, Greengard P.** (2010) Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature*. 467(7311):95-8.
- He X., Chang W. P., Koelsch G., Tang J.** (2002). Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2. *FEBS Lett*. 524 183–187.
- He X., Li F., Chang W. P., Tang J.** (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J. Biol. Chem.* 280 11696–11703.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretzschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, et al** (2000): Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci*, 20:7951-7963. [SEP]
- Heneka MT, Landreth GE, Feinstein DL.** (2001) Role for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 49(2):276.
- Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, Riederer P, Feinstein DL, Klockgether T.** (2001) Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60(9):906-16.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretzschmar H, Sisodia S, Muller U** (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23: 4106–4115
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretzschmar H, Sisodia S, Muller U** (2004): Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J*, 23:4106-4115. [SEP]
- Hernandez, F. y Avila, J.** (2008). The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 582, 3848-3854.
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT** (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 73:384-399.
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT** (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem Pharmacol* 70:770-785.
- Ho C, Hicks J, Salter MW** (1995) A novel P2-purinoreceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *Br J Pharmacol* 116: 2909-2918.

- Hoe HS, Lee KJ, Carney RS, Lee J, Markova A, Lee JY, Howell BW, Hyman BT, Pak DT, Bu G, Rebeck GW (2009b). Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J Neurosci.* 29(23):7459-73.
- Hoe HS, Fu Z, Makarova A, Lee JY, Lu C, Feng L, Pajoohesh-Ganji A, Matsuoka Y, Hyman BT, Ehlers MD, et al. (2009a). The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *J Biol Chem* 284: 8495–8506.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202-207.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF (2006) A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1376-1385.
- Hook V, Toneff T, Boggyo M, Greenbaum D, Medzihradszky KF, Neveu J, Lane W, Hook G, Reisine T (2005): Inhibition of cathepsin B reduces beta-amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate beta-secretase of Alzheimer's disease. *Biol Chem*, 386:931-940.
- Hook VY, Kindy M, Reinheckel T, Peters C, Hook G (2009): Genetic cathepsin B deficiency reduces beta-amyloid in transgenic mice expressing human wild-type amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 386:284-288. [SEP]
- Hou M, Malmsjo M, Moller S, Pantev E, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, Erlinge D. (1999) Increase in cardiac P2X1- and P2Y2-receptor mRNA levels in congestive heart failure. *Life Sci.* 65:1195–1206.
- Hou M, Moller S, Edvinsson L, Erlinge D. (2000) Cytokines induce upregulation of vascular P2Y2 receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2064–2069.
- Housley GD, Luo L, Ryan AF (1998) Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 393:403-414.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3228–3233.
- Hu D, Bi X, Fang W, Han A, Yang W. (2009) GSK3beta is involved in JNK2-mediated beta-catenin inhibition. *PLoS One.* 4(8):e6640.

- Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R** (2006): Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*, 9:1520-1525.
- Hu, S., Begum, A.N., Jones, M.R., Oh, M.S., Beech, W.K., Beech, B.H. et al.** (2009). GSK-3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol Dis* 33, 193-206.
- Hughes K, Pulverer BJ, Theocharous P, Woodgett JR.** (1992) Baculovirus-mediated expression and characterisation of rat glycogen synthase kinase-3 beta, the mammalian homologue of the *Drosophila melanogaster* zeste-white 3sgg homeotic gene product. *Eur J Biochem*. 203(1-2):305-11.
- Humphreys BD, Dubyak GR** (1996) Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol* 157:5627-5637.
- Humphreys BD, Virginio C, Surprenant A, Rice J, Dubyak GR** (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol* 54:22-32.
- Huse JT, Liu K, Pijak DS, Carlin D, Lee VM, Doms RW** (2002): Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*, 277:16278-16284.
- Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW** (2000): Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem*, 275:33729-33737. [11 SEP]
- Hussain I, Powell DJ, Howlett DR, Chapman GA, Gilmour L, Murdock PR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Schneider K, et al** (2000): ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Mol Cell Neurosci*, 16:609-619.
- Hutchings H, Ortega N, Plouët J.** (2003) Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J*. Aug;17(11):1520-2.
- Illes P, Alexandre Ribeiro J** (2004) Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 483:5-17.
- Inoue K., Koizumi S. and Tsuda M.** (2007) The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J. Neurochem*. 102, 1447–1458.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y** (1994): Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13:45-53. [11 SEP]

- J.A. McCubrey, L.S. Steelman, F.E. Bertrand, N.M. Davis, M. Melissa, S.L. Abrams, G. Montalto, B.A. D'Assoro, M. Libra, F. Nicoletti, R. Maestro, J. Basecke, D. Rakus, A. Gizak, Z. Demidenko, L. Cocco, M.M. Alberto, M. Cervello**, (2014) GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer, *Oncotarget* 5 2881e2911.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr** (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32:4693-4697. [L] [SEP]
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A** (2000b) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* 58:82-88.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA** (2000a) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275:34190-34196.
- Jin R, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E** (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nature neuroscience* 6:803-810.
- Johnston JA, Liu WW, Todd SA, Coulson DT, Murphy S, Irvine GB, Passmore AP** (2005): Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*, 33:1096-1100.
- Joep RS, Johnson GV.** (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 29:95–102.
- Joep, R. S., Yuskaitis, C. J., and Beurel, E.** (2007). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577–595.
- Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, Snellinx A, Craessaerts K, Thathiah A, Tesseur I, et al** (2010): The disintegrin/ metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci*, 30:4833-4844. [L] [SEP]
- Kaczmarek, E., Erb, L., Koziak, K., Jarzyna, R., Wink, M. R., Guckelberger, O., Blusztajn, J. K., Trinkaus-Randall, V., Weisman, G. A. and Robson, S. C.** (2005). Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost* 93, 735-42.
- Kahlenberg JM, Dubyak GR** (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1100-1108.
- Kang J, Muller-Hill B** (1990): Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 166:1192-1200. [L] [SEP]



- Kannan S.** (2003) Neutrophil chemotaxis: potential role of chemokine receptors in extracellular nucleotide induced Mac-1 expression. *Med Hypotheses*. 61(5-6):577-9.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E** (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460:592-598.
- Kaytor MD, Orr HT** (2002) The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol* 12: 275–278.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP** (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53:107-118.
- Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, Jones A** (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci* 23:7426-7437.
- Kibbey MC, Jucker M, Weeks BS, Neve RL, Van Nostrand WE, Kleinman HK.** (1993) beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(21):10150-3.
- Kim HJ, Ajit D, Peterson TS, Wang Y, Camden JM, Gibson Wood W, Sun GY, Erb L, Petris M, Weisman GA.** (2012) Nucleotides released from A $\beta$ <sub>1-42</sub> - treated microglial cells increase cell migration and A $\beta$ <sub>1-42</sub> uptake through P2Y<sub>2</sub> receptor activation. *J Neurochem*. 121(2):228-38. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07700.x. Epub 2012 Mar 14. PubMed PMID: 22353164; PubMed Central PMCID: PMC3323761.
- Kim HS, Kim EM, Lee JP, Park CH, Kim S, Seo JH, Chang KA, Yu E, Jeong SJ, Chong YH, et al** (2003): C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 $\beta$  expression. *Faseb J* 17:1951-1953.
- Kim L., Kimmel A. R.** (2000). GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 508-514.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A** (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J* 20:6347-6358.
- Kim SY, Moon JH, Lee HG, Kim SU, Lee YB.** (2007) ATP released from beta-amyloid-stimulated microglia induces reactive oxygen species production in an autocrine fashion. *Exp Mol Med*. 39(6):820-7.
- Kim, K. C., Park, H. R., Shin, C. Y., Akiyama, T. and Ko, K. H.** (1996). Nucleotide-induced mucin release from primary hamster tracheal surface epithelial cells involves the P2U purinoceptor. *Eur. Resp. J.* 9, 542–8.
- Kimberly W. T., LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., Ye W., Wolfe M. S., Selkoe D. J.** (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1 and Pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 6382–6387.

- King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G** (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20:4871-4877.
- King BF, Townsend-Nicholson A** (2003) Nucleoside and nucleotide receptors. *Tocris Review* 23:1-11.
- Kinoshita A, Whelan CM, Berezovska O, Hyman BT** (2002): The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem*, 277:28530-28536.
- Kirischuk S, Scherer J, Kettenmann H, Verkhratsky A.** (1995) Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca<sup>2+</sup> release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *J. Physiol.* 483(Pt 1):41–57.
- Kitazawa M., Yamasaki T. R., LaFerla F. M.** (2004). Microglia as a potential bridge between the amyloid  $\beta$ -peptide and tau. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1035, 85–103.
- Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S** (1999): Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*, 343(Pt 2):371-375.
- Kong Q, Peterson TS, Baker O, Stanley E, Camden J, Seye CI, Erb L, Simonyi A, Wood WG, Sun GY, Weisman GA.** (2009) Interleukin-1 $\beta$  enhances nucleotide-induced and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing in rat primary cortical neurons via up-regulation of the P2Y(2) receptor. *J Neurochem.* 109(5):1300-10.
- Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS:** (1996) Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:1683-1688.
- Koshiba M, Apasov S, Sverdlov V, Chen P, Erb L, Turner JT, Weisman GA, Sitkovsky MV.** (1997) Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ;94:831–836.
- Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, et al** (1996): Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med*, 2:224-229.
- Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF** (2010): ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *Embo J*, 29:3020-3032.
- Krishtal OA, Marchenko SM, Pidoplichko VI** (1983) Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neurosci Lett* 35:41-45.

- Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Roßner S, Lichtenthaler SF.** (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive  $\alpha$ -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal*. ;29:3020–3032.
- Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sevigny J** (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic signalling* 1:193-204.
- Kumari R, Goh G, Ng LL, Boarder MR.** (2003) ATP and UTP responses of cultured rat aortic smooth muscle cells revisited: dominance of P2Y2 receptors. *Br J Pharmacol*. 140:1169–1176.
- Kunapuli S.P., Daniel J.L.** (1998) P2 receptors subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* ;336:513–523.
- Lai, M.K., Tan, M.G., Kirvell, S., Hobbs, C., Lee, J., Esiri, M.M., Chen, C.P. y Francis, P.T** (2008). Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *J Neural Transm* 115, 1165–1172.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F** (1999): Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:3922-3927. [L]  
[SEP]
- Lau KF, McLoughlin DM, Standen C, Miller CC** (2000): X11  $\alpha$  and x11  $\beta$  interact with presenilin-1 via their PDZ domains. *Mol Cell Neurosci*, 16:557-565. [L]  
[SEP]
- Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK** (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 64:785-795.
- Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC, and Harden TK** (1995) Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinergic receptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br J Pharmacol* 116:1619–1627.
- Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Brown HA, Boucher RC, Harden TK.** (1996) Enzymatic synthesis of UTP  $\gamma$  S, a potent hydrolysis resistant agonist of P2U-purinoreceptors. *Br J Pharmacol*. Jan;117(1):203-9.
- Le Feuvre R, Brough D, Rothwell N** (2002) Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 447:261-269.
- Lechner SG, Boehm S** (2004) Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors. *Purinergic signalling* 1:31-41.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M** (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388:674-678.

- Lee, H.G., Won, S.M., Gwag, B.J., Lee, Y.B.,** (2011). Microglial P2X receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Mol. Med.* 43, 7–14.
- Leon D, Hervas C, Miras-Portugal MT** (2006) P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* 23:2999-3013.
- Leon D, Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Miras-Portugal MA** (2008) Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 52:1148-1159.
- Leroy K, Brion JP.** (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in rat brain. *J Chem Neuroanat.* 16:279–293.
- Leroy K., Boutajangout A., Authelet M., Woodgett J. R., Anderton B. H., Brion J. P.** (2002). The active form of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 103, 91–99. 10.1007/s004010100435.
- Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MB** (2003): Neuroprotection and neurorescue against A $\beta$  toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J*, 17:952-954. [SEP]
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., et al.** (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269 (5226) :973-7.
- Leyssen, M., Ayaz, D., Hébert, S. S., Reeve, S., De Strooper, B., and Hassan B. A.** (2005). Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the Drosophila brain. *EMBO J* 24, 2944-2955.
- Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ** (2000): Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:6138-6143.
- Li, R., N. Mitra, H. Gratkowski, G. Vilaire, R. Litvinov, C. Nagasami, J.W. Weisel, J.D. Lear, W.F. DeGrado, and J.S. Bennett.** (2003). Activation of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science*.300:795–798.
- Lin JW, Sugimori M, Llinas RR, McGuinness TL, Greengard P** (1990) Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8257-8261.
- Liu GJ, Brockhausen J, Bennett MR** (2003) P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci* 108:12-16.

- Liu J., Liao Z., Camden J., Griffin K.D., Garrad R.C., Santiago-Pérez L.I., González F.A., Seye C.I., Weisman G.A., Erb L.** (2004). Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 279:8212–8218 10.1074/jbc.M312230200
- Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, Herz J, Muglia L, Bu G** (2007): Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron*, 56:66-78.
- Liu X, Surprenant A, Mao HJ, Roger S, Xia R, Bradley H, Jiang LH** (2008) Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Mol Pharmacol* 73:252-259.
- Liu Y, Zhang YW, Wang X, Zhang H, You X, Liao FF, Xu H.** (2009) Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1. *J Biol Chem.* 284:12145–12152.
- Lopez-Perez E, Zhang Y, Frank SJ, Creemers J, Seidah N, Checler F** (2001): Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro- hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem*, 76:1532-1539.
- Lorenzo, A., Yankner, B.A.,** (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12243–12247.
- Lovestone S, Reynolds CH** (1997). The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative process. *Neurosci* 78:309–324.
- Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH** (2003): Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J Neurochem*, 87:733-741. [L]  
[SEP]
- Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH: Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. J Neurochem, 87:733-741.** [L]  
[SEP]
- Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, [L]  
[SEP]Xu H** (2003): PEN-2 and APh-1 coordinately regulate proteolytic processing of [L]  
[SEP]presenilin 1. *J Biol Chem*, 278:7850-7854. [L]  
[SEP]
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, et al** (2001): Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta- secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*, 4:231-232.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R.** (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*;4(3):231-2. PubMed PMID: 11224535.

- Lustig K.D., Shiau A.K., Brake A., Julius D.** (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5113–5117.
- Lustig K.D., Sportiello M.G., Erb L., Weisman G.A.** (1992) A nucleotide receptor in vascular endothelial cells is specifically activated by the fully ionized forms of ATP and UTP. *Biochem. J.* 284:733–739.
- Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ.** (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem.* 272(7):4637-44.
- Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA, Jarvis MF** (1999) Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56:1171-1181.
- Ma T, Zhao Y, Kwak YD, Yang Z, Thompson R, Luo Z, Xu H, Liao FF** (2009): Statin's excitoprotection is mediated by sAPP and the subsequent attenuation of calpain-induced truncation events, likely via rho-ROCK signaling. *J Neurosci*, 29:11226-11236. [11 SEP]
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinezek B, Mandelkow E.** (1995) Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol. Aging*; 16:355–362.
- Marcade M, Bourdin J, Loiseau N, Peillon H, Rayer A, Drouin D, Schweighoffer F, Desire L** (2008): Etazolate, a neuroprotective drug linking GABA (A) receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*, 106:392-404. [11 SEP]
- Marin-Garcia P, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Leon D, Miras-Portugal MT** (2008) Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. *Neuroscience* 151:361-373.
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A** (2007) Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *J Neurosci* 27:1456-1466.
- Mattson MP** (1997): Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*, 77:1081-1132. [11 SEP]
- McGeer, P.L., McGeer, E.G.,** (1996). Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 213–220.
- McLarnon JG, Ryu JK, Walker DG, Choi HB** (2006) Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1090-1097.
- Menendez-Gonzalez M, Perez-Pinera P, Martinez-Rivera M, Calatayud MT, Blazquez Menes B** (2005): APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegener Dis*, 2:277-283. [11 SEP]

- Merlos-Suarez A, Ruiz-Paz S, Baselga J, Arribas J** (2001): Metalloprotease-dependent protransforming growth factor- $\alpha$  ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. *J Biol Chem*, 276:48510-48517.
- Meshki J, Tuluc F, Bredeteau O, Ding Z, Kunapuli SP.** (2004) Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y<sub>2</sub> receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286(2):C264-71.
- Michel AD, Chambers LJ, Clay WC, Condreay JP, Walter DS, Chessell IP** (2007) Direct labelling of the human P2X<sub>7</sub> receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *Br J Pharmacol* 151:103-114.
- Miki A, Tanaka Y, Ogata S, Ikehara Y** (1986) Selective preparation and characterization of membranous and soluble forms of alkaline phosphatase from rat tissues. A comparison with the serum enzyme. *Eur J Biochem* 160:41-48.
- Millan JL** (2006) Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic signalling* 2:335-341.
- Minniti, A. N., Rebolledo, D. L., Grez, P. M., Fadic, R., Aldunate, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., Opazo, C., Masters, C., Bush, A. I., et al.** (2009). Intracellular amyloid formation in muscle cells of Ab-transgenic *Caenorhabditis elegans*: determinants and physiological role in copper detoxification. *Mol Neurodegener* 4, 2.
- Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Giraldez L, Hervas C, Gomez-Villafuertes R, Sen RP, Gualix J, Pintor J** (2003) P2X<sub>7</sub> receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem Res* 28:1597-1605.
- Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA.** (2009) The P2X<sub>7</sub> receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X<sub>7</sub>R pore. *J Neurosci*. 9(12):3781-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5512-08.2009.
- Moore D, Chambers J, Waldvogel H, Faull R, Emson P** (2000) Regional and cellular distribution of the P2Y<sub>1</sub> purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *J Comp Neurol* 421:374-384.
- Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, Emson PC, Murdock PR** (2001) Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta* 1521:107-119.
- Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA** (2002): Intraneuronal Abeta<sub>42</sub> accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid*, 9:88-102. [SEP]

- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L** (2010): A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis*, 19:441-449.
- Mucke L, Masliah E, Yu G-Q, Mallory M, Rockenstein EM; Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L** (2000): High-level Neuronal Expression of Ab1-42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation. *J Neurosci*. 20(11):4050-8.
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC.** (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem*. 81:1073–1083.
- Murayama KS, Kametani F, Saito S, Kume H, Akiyama H, Araki W** (2006): Reticulons RTN3 and RTN4-B/C interact with BACE1 and inhibit its ability to produce amyloid beta-protein. *Eur J Neurosci*, 24:1237-1244.
- Muresan Z, Muresan V** (2005): Coordinated transport of phosphorylated amyloid-beta precursor protein and c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-1. *J Cell Biol*, 171:615-625.
- Murthy KS, Makhlof GM** (1998). Coexpression of ligand-gated P2X and G protein-coupled P2Y receptors in smooth muscle. Preferential activation of P2Y receptors coupled to phospholipase C (PLC)-beta1 via Galphaq/11 and to PLC-beta3 via Gbetagamma3. *J Biol Chem*. 273(8):4695-704.
- Nagaya N, Tittle RK, Saar N, Dellal SS, Hume RI** (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem* 280:25982-25993.
- Nakazawa K, Inoue K, Koizumi S, Inoue K** (1994) Facilitation by 5-hydroxytryptamine of ATP-activated current in rat pheochromocytoma cells. *Pflugers Arch* 427:492-499.
- Nakazawa K, Ohno Y** (1999) Neighboring glycine residues are essential for P2X2 receptor/channel function. *Eur J Pharmacol* 370:R5-6.
- Nakazawa K, Ojima H, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, Ohno Y** (2004) Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. *Eur J Pharmacol* 483:29-35.
- Neary J. T., Kang Y., Bu Y. YuE., Akong K. and Peters C. M.** (1999) Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J. Neurosci*. 19, 4211–4220.
- Neary J. T., Kang Y., Willoughby K. A. and Ellis E. F.** (2003) Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J. Neurosci*. 23, 2348–2356.



- Neary J. T., Rathbone M. P., Cattabeni F., Abbracchio M. P. and Burnstock G.** (1996) Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 19, 13–18.
- Neary J.T., Zhu Q., Norenberg M.D.** (1994) ATP signalling in astocytes: activation of MAP kinase. *Drug Dev. Res.* 31:302.
- Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA** (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem* 49:3659-3666.
- Nicke A** (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 377:803-808.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G** (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J* 17:3016-3028.
- Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, Gorecki DC, Murrell-Lagnado RD, Soto F** (2009) A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* 284:25813-25822.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M** (2009): APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 457:981-989. [L]  
[SEP]
- Noble W, Planel E, Zehr C, et al.** (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* ;102:6990–6995.
- Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE, Greengard P** (1993): Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem*, 268:608-612.
- Norenberg W, Illes P** (2000) Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:324-339.
- North RA** (1996) Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol* 8:474-483.
- North RA** (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, et al** (2006): Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 26:10129-10140.
- Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM.** (2004) Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late,

- hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*. ;43:321–332.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM** (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39:409-421. [SEP]
- Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM** (2006): A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am J Pathol*, 168:184-194. [SEP]
- Ogata S, Hayashi Y, Takami N, Ikehara Y.** (1988) Chemical characterization of the membrane-anchoring domain of human placental alkaline phosphatase. *J Biol Chem*. 263(21):10489-94.
- Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R** (2007): BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 26:134-145.
- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF** (2004): BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 41:27-33.
- Ohsawa K, Irino Y, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S.** (2010) P2Y<sub>12</sub> receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia*. May;58(7):790-801.
- Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Macip S, Sagara J, Nakayama KI, Aaronson SA, Lee SW** (2004) ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* 6:121-128.
- Olah ME, Stiles GL** (2000) The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther* 85:55-75.
- Ortega F, Perez-Sen R, Delicado EG, Miras-Portugal MT** (2009) P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotox Res* 15:193-204.
- Ortega F, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT** (2008) Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J Neurochem* 104:62-73.
- Ortega F, Perez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT** (2010) P2X<sub>7</sub>, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*. **67 (10):1723-33**
- Oster-Granite ML, McPhie DL, Greenan J, Neve RL** (1996): Age-dependent [SEP]neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C [SEP]terminus of the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 16:6732-6741.
- Otero M, Garrad RC, Velazquez B, Hernandez-Perez MG, Camden JM, Erb L, Clarke LL, Turner JT, Weisman GA, Gonzalez FA** (2000): Mechanisms

- of agonist-dependent and -independent desensitization of a recombinant P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor. *Mol Cell Biochem* 205: 115–123,
- Palop J J, Jones B, Kekonius L, Chin J, Yu G-Q, Raber J, Masliah E, Mucke L** (2003): Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *PNAS*, 100: 9572-9577.
- Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O** (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10:3898-3902.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA** (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452:589-597.
- Panza F., Frisardi V., Solfrizzi V., Imbimbo B.P., Logroscino G., et al.** (2011). Interacting with gamma-secretase for treating Alzheimer's disease: from inhibition to modulation. *Curr Med Chem* 18, 5430-5447.
- Papp L, Vizi ES, Sperlagh B** (2007) P2X<sub>7</sub> receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 355:568-574.
- Pardossi-Piquard R, Bohm C, Chen F, Kanemoto S, Checler F, Schmitt-Ulms G, St George-Hyslop P, Fraser PE** (2009): TMP21 transmembrane domain regulates gamma-secretase cleavage. *J Biol Chem*, 284:28634-28641.
- Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Muller U, et al** (2005): Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron*, 46:541-554
- Park SA, Shaked GM, Bredesen DE, Koo EH** (2009): Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 388:450-455.
- Parr C.E., Sullivan D.M., Paradiso A.M., Lazarowski E.R., Burch L.H., Olsen J.C., Erb L., Weisman G.A., Boucher R.C., Turner J.T** (1994) Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* ;91:3275–3279.
- Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R** (2003) P2X<sub>7</sub> mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278:13309-13317.
- Patel, K., Barnes, A., Camacho, J., Paterson, C., Boughtflower, R., Cousens, D., et al.** (2001) Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321 N6 cells. *Eur J Pharmacol* 430 (2-3) 203–10.

- Pearson, P. J., Evora, P. R. and Schaff, H. V.** (1992a). Bioassay of EDRF from internal mammary arteries: implications for early and late bypass graft patency. *Ann Thorac Surg* 54, 1078-84.
- Pearson, P. J., Lin, P. J. and Schaff, H. V.** (1992b). Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery. A possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103, 1147-54.
- Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* Jan;56(1):70-8.
- Pendergast W, Yerxa BR, Douglass JG 3rd, Shaver SR, Dougherty RW, Redick CC, Sims IF, Rideout JL.** (2001) Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates. *Bioorg Med Chem Lett.* 11(2):157-60.
- Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, Sun GY, Erb L, Petris MJ, Weisman GA.** (2010) P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol Neurobiol.* 41(2-3):356-66.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS.** (2003) GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature.* 423(6938):435-9.
- Pidgeon GP, Tang K, Cai YL, Piasentin E, Honn KV** (2003) Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing  $\alpha\text{v}\beta 3$  and  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin expression. *Cancer Res.* 63(14), 4258–4267.
- Pillois X., Chaulet H., Belloc I., Dupuch F., Desgranges C., Gadeau A.P.** (2002) Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* ;90:678–681.
- Pintor J, Porras A, Mora F, Miras-Portugal MT** (1993) Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from caudate putamen of conscious rat. *Neurosci Lett* 150:13-16.
- Pintor J, Porras A, Mora F, Miras-Portugal MT** (1995) Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat. *J Neurochem* 64:670-676.
- Pintor J, Rotllan P, Torres M, Miras-Portugal MT** (1992) Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem* 200:296-300.
- Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT** (1991) Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci* 48:2317-2324.
- Potucek YD, Crain JM, Watters JJ** (2006) Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. *Neurochem Int* 49:204-214.

- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O.** (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*. 28:14537–14545.
- Qi AD, Wolff SC, Nicholas RA.** (2005) The apical targeting signal of the P2Y2 receptor is located in its first extracellular loop. *J Biol Chem*. 280(32):29169-75.
- Rama N., Goldschneider D., Corset V., Lambert J., Pays L., and Mehlen P.** (2012). Amyloid precursor protein regulates netrin-1-mediated commissural axon outgrowth. *J Biol Chem* 287, 30014–30023.
- Ramaker J. M., Swanson T. L., and Copenhaver P. F.** (2013). Amyloid precursor proteins interact with the heterotrimeric G protein Go in the control of neuronal migration. *J Neurosci* 33, 10165–10181.
- Rampe, D.; Wang, L.; Ringheim, G.E.** (2004) P2X7 receptor modulation of  $\beta$ -amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *J. Neuroimmunol.*, 147, 56–61. [L]  
[SEP]
- Rettinger J, Schmalzing G** (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121:451-461.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A** (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330.
- Rice W.R., Burton F.M., Fiedeldey D.T.** (1995) Cloning and expression of the alveolar type II cell P2U-purine receptor. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12:27–32.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, et al** (2007): The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*, 27:7817-7826. [L]  
[SEP]
- Roberts JA, Evans RJ** (2004) ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J Biol Chem* 279:9043-9055.
- Roberts JA, Evans RJ** (2006) Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. *J Neurochem* 96:843-852.
- Roberts SB, Ripellino JA, Ingalls KM, Robakis NK, Felsenstein KM** (1994): Non- amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J Biol Chem*, 269:3111-3116.
- Robles E, Huttenlocher A, Gomez TM** (2003): Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain. *Neuron*, 38:597-609.

- Robson SC, Seigny J, Zimmermann H** (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2:409-430.
- Rockenstein E, Torrance M, Adame A, Mante M, Bar-on P, Rose JB, Crews L, Masliah E.** (2007) Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. *J Neurosci.*;27(8):1981-91.
- Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, Miras-Portugal MT** (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem* 51:1696-1703.
- Roger S, Mei ZZ, Baldwin JM, Dong L, Bradley H, Baldwin SA, Surprenant A, Jiang LH** (2010) Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J Psychiatr Res* 44:347-355.
- Roger S, Pelegrin P, Surprenant A** (2008) Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J Neurosci* 28:6393-6401.
- Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ** (1997): Cell- specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, 47:147-156.
- Ryan KA, Pimplikar SW.** (2005) Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J Cell Biol.* 171(2):327-35..
- Rylatt DB, Aitken A, Bilham T, Condon GD, Embi N, Cohen P.** (1980) Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* 107:529–537.
- Ryu, J.K.; McLarnon, J.G.** (2008) Block of purinergic P2X7 receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 19, 1715–1719. [SEP]
- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P.** (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol.* 153(7):1403-14
- abo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P.** (2003) The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *J Neurosci.* 23(13):5407-15.
- Salter MW, De Koninck Y, Henry JL** (1993) Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41:125-156.

- Sanchez I, Mahlke C, Yuan J.** (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421:373-9.
- Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Leon D, Leon-Otegui M, Salas E, Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2009) Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors. *Neurochem Int* 55:671-682.
- Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Miras-Portugal MT** (2005) Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS Lett* 579:3783-3788.
- Santiago-Perez LI, Flores RV, Santos-Berrios C, Chorna NE, Krugh B, Garrad RC, Erb L, Weisman GA, Gonzalez FA** (2001): P2Y(2) nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* 187: 196–208.
- Sanz J.M., Chiozzi P., Ferrari D., Colaïanna M., Idzko M., Falzoni S., Fellin R., Trabace L., Di Virgilio F.,** (2009). Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.* 182, 4378–4385.
- Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G** (2006): Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell*, 127:185-197.
- Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, <sup>[SEP]</sup>Teplov DB, Haass C** (2001): Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*, 2:835-841. <sup>[SEP]</sup>
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y** (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5683-5686.
- Sawynok J, Downie JW, Reid AR, Cahill CM, White TD** (1993) ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res* 610:32-38.
- Schafer R, Sedehizade F, Welte T, Reiser G** (2003) ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285: L376–L385
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, et al** (1996): Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2:864-870. <sup>[SEP]</sup>
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R** (1998): Notch-1 signalling requires ligand- induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, 393:382-386.

- Scott CW, Blowera DP, Barth PT, Lo MMST, Salana AI, Capato CB.** (1991) Differences in the abilities of human tau isoforms to promote microtubule 31. assembly. *J Neurosci Res*; 30:4225–4230.
- Selkoe DJ** (1998): The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, 8:447-453. [SEP]
- Selkoe D.J.** (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al** (1992): Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, 359:325-327.
- Shankar GM, Walsh DM** (2009): Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Abeta. *Mol Neurodegener*, 4:48. [SEP]
- Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, Skarratt KK, Saunders BM, Tan KS, Gu BJ, Fuller SJ, Britton WJ, Petrou S, Wiley JS** (2006) A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem* 281:2079-2086.
- Shen J, Seye CI, Wang M, Weisman GA, Wilden PA, Sturek M.** (2004) Cloning, upregulation, and mitogenic pole of porcine P2Y2 receptor in coronary artery smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 66:1265–1274.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al.** (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shi Q, Prior M, He W, Tang X, Hu X, Yan R** (2009): Reduced amyloid deposition in mice overexpressing RTN3 is adversely affected by preformed dystrophic neurites. *J Neurosci*, 29:9163-9173.
- Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN.** (2004) APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol.* 14:2025–2032.
- Simon J, Kidd EJ, Smith FM, Chessell IP, Murrell-Lagnado R, Humphrey PP, Barnard EA** (1997) Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol* 52:237-248.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, et al** (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, 402:537-540. [SEP]
- Sisodia S.S.** (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6075-6079.



- Sneddon P, Westfall TD, Todorov LD, Todorova SM, Westfall DP, Nickel P, Kennedy C** (2000) The effect of P2 receptor antagonists and ATPase inhibition on sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol* 129:1089-1094.
- Sokolova E, Skorinkin A, Fabbretti E, Masten L, Nistri A, Giniatullin R** (2004) Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation. *Br J Pharmacol* 141:1048-1058.
- Soldano A, Hassan B A** (2014): Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease. *CO Neurobiology*. 27:61-7
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA** (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276:125-132.
- Soltoff S.P., Avraham H., Avraham S., Cantley L.C.** (1998) Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogenactivated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 273:2653–2660.
- Soltoff SP.** (1998) Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor. Phorbol ester or [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation can substitute for receptor activation. *J Biol Chem.* ;273 (36:23110–23117.
- Soriano S, Lu DC, Chandra S, Pietrzik CU, Koo EH** (2001): The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP) is independent of its cleavage by caspases. *J Biol Chem*, 276:29045-29050. <sup>[1]</sup><sub>SEP</sub>
- Sosa LJ, Bergman J, Estrada-Bernal A, Glorioso TJ, Kittelson JM, Pfenninger KH.** (2013) Amyloid precursor protein is an autonomous growth cone adhesion molecule engaged in contact guidance. *PLoS One*. May 14;8(5):e64521.
- Sperlagh B, Heinrich A, Csolle C** (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic signalling* 3:269-284.
- Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P** (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78:327-346.
- Stalder M., Phinney A., Probst A., Sommer B., Staufenbiel M., Jucker M.,** (1999). Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 154, 1673–1684.
- Stefan C, Jansen S, Bollen M** (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* 30:542-550.
- Steiner H, Fluhrer R, Haass C.** (2008) Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem*. 283(44):29627-31.

- Stokes L, Fuller SJ, Sluyter R, Skarratt KK, Gu BJ, Wiley JS** (2010) Two haplotypes of the P2X7 receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1{beta} secretion. *FASEB J.* 2916-27
- Su Y, Ryder J, Li B, Wu X, Fox N, Solenberg P, Brune K, Paul S, Zhou Y, Liu F, Ni B.** (2004) Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry* 43(22):6899-908.
- Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J** (2001) Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9983-9988.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G** (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
- Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, Ishiguro K, Yamaguchi H.** (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res.* (4):317-23.
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K.** (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett.* 203(1):33-6.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T** (2003): The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*, 422:438-441. [L]  
[SEP]
- Takenouchi T, Sekiyama K, Sekigawa A, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Iwamaru Y, Kitani H, Hashimoto M.** (2010) P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 58(2):91-6.
- Tamayev R, Zhou D, D'Adamio L** (2009): The interactome of the amyloid beta precursor protein family members is shaped by phosphorylation of their intracellular domains. *Mol Neurodegener*, 4:28. [L]  
[SEP]
- Tarassishin L, Yin YI, Bassit B, Li YM** (2004): Processing of Notch and amyloid precursor protein by gamma-secretase is spatially distinct. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:17050-17055.
- Tesco G, Koh YH, Kang EL, Cameron AN, Das S, Sena-Esteves M, Hiltunen M, Yang SH, Zhong Z, Shen Y, et al** (2007): Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron*, 54:721-737.

- Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP** (1997) Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387:76-79.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM** (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274:6653-6659.
- Toth-Zsamboki E, Oury C, Watanabe H, Nilius B, Vermeylen J, Hoylaerts MF** (2002) The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function. *FEBS Lett* 524:15-19
- Tran, M. D.** (2011) P2 receptor stimulation induces amyloid precursor protein production and secretion in rat cortical astrocytes. *Neuroscience Letters*. 492, 155–159.
- Turner JT, Weisman GA, Landon LA, Park M, Camden JM.** (1998) Salivary gland nucleotide receptors: evidence for functional expression of both P2X and P2Y subtypes. *Eur J Morphol*. 36 Suppl:170-5.
- Tyan SH, Shih AY, Walsh JJ, Maruyama H, Sarsoza F, Ku L, Eggert S, Hof PR, Koo EH, Dickstein DL.** (2012) Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol Cell Neurosci*. 51(1-2):43-52.
- Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ** (2002): alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 299:373-376. [SEP]
- Vacca F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C** (2004) P2X3 receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res* 76:653-661.
- Varma R, Chai Y, Troncoso J, Gu J, Xing H, Stojilkovic SS, Mattson MP, Haughey NJ.** (2009) Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med*;11(2):63-75.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, [SEP]Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, et al** (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286:735-741. [SEP]
- Velázquez B, Garrad RC, Weisman GA, González FA.** (2000) Differential agonist-induced desensitization of P2Y2 nucleotide receptors by ATP and UTP. *Mol Cell Biochem*. 206(1-2):75-89.
- Vetrivel KS, Gong P, Bowen JW, Cheng H, Chen Y, Carter M, Nguyen PD, Placanica L, Wieland FT, Li YM, et al** (2007): Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *Mol Neurodegener*, 2:4.
- Vial C, Evans RJ** (2005) Disruption of lipid rafts inhibits P2X1 receptor-mediated currents and arterial vasoconstriction. *J Biol Chem* 280:30705-30711.
- Vial C, Roberts JA, Evans RJ** (2004b) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25:487-493.

- Vial C, Tobin AB, Evans RJ** (2004a) G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *Biochem J* 382:101-110.
- Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Muller U, et al** (2005): Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron*, 46:541-554.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A** (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1285-1294.
- Vollmayer P, Clair T, Goding JW, Sano K, Servos J, Zimmermann H** (2003) Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem* 270:2971-2978.
- Volonte C, D'Ambrosi N** (2009) Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS J* 276:318-329.
- von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS** (1997): Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging*, 18:661-669. [SEP]
- von Kugelgen I** (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110:415-432.
- von Kugelgen I, Wetter A** (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:310-323.
- von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U** (2004): The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci*, 117:4435-4448.
- Wahle T, Prager K, Raffler N, Haass C, Famulok M, Walter J** (2005): GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans- Golgi network. *Mol Cell Neurosci*, 29:453-461.
- Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C** (2001): Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem*, 276:14634-14641. [SEP]
- Wang R, Tang P, Wang P, Boissy RE, Zheng H** (2006): Regulation of tyrosinase trafficking and processing by presenilins: partial loss of function by familial Alzheimer's disease mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:353-358.
- Wang Z, Wang B, Yang L, Guo Q, Aithmitti N, Songyang Z, Zheng H** (2009) Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J Neurosci* 29: 10788–10801.

- Wang M.; Kong Q.; Gonzalez F.A.; Sun G.; Erb L.; Seye C.; Weisman G.A.** (2005) P2Y nucleotide <sup>[SEP]</sup>receptor interaction with  $\alpha_v$  integrin mediates astrocyte migration. *J. Neurochem.*, 95, 630–640. <sup>[SEP]</sup>
- Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F** (1992): <sup>[SEP]</sup>Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:10758-10762. <sup>[SEP]</sup>
- Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE** (1993): Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet*, 5:95-100.
- Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D.** (2000) beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol.* 392(3):117-23.
- Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G** (2002): A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry*, 41:2825-2835. <sup>[SEP]</sup>
- Weisman GA, Erb L** (2012): P2Y Receptors in the Mammalian Nervous System: Pharmacology, Ligands and Therapeutic Potential. CNS & NEUROLOGICAL DISORDERS DRUG TARGETS .
- Weisman GA, Garrad RC, Erb LJ, Otero M, Gonzalez FA, Clarke LL.** (1998) Structure and function of P2Y2 nucleotide receptors in cystic fibrosis (CF) epithelium. *Adv Exp Med Biol.* 431:417-24.
- Weisman GA, Garrad RC, Erb LJ, Santos-Berrios C, Gonzalez FA.** (1999) P2Y receptors in the nervous system: molecular studies of a P2Y2 receptor subtype from NG108-15 neuroblastomaxglioma hybrid cells. *Prog Brain Res.* 120:33–43.
- Welch BD, Carlson NG, Shi H et al** (2003) P2Y2 receptor-stimulated release of prostaglandin E2 by rat inner medullary collecting duct preparations. *Am J Physiol* 285:F711–F721
- Werner P, Seward EP, Buell GN, North RA** (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15485-15490
- Wilden PA, Agazie YM, Kaufman R, Halenda SP.** (1998) ATP-stimulated smooth muscle cell proliferation requires independent ERK and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol.* 275:H1209–15.
- Wildman SS, Brown SG, Rahman M, Noel CA, Churchill L, Burnstock G, Unwin RJ, King BF** (2002) Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Mol Pharmacol* 62:957-966.

- Wildman SS, Unwin RJ, King BF.** (2003) Extended pharmacological profiles of rat P2Y<sub>2</sub> and rat P2Y<sub>4</sub> receptors and their sensitivity to extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions. *Br J Pharmacol.* 140(7):1177-86.
- Wiley JS, Dao-Ung LP, Li C, Shemon AN, Gu BJ, Smart ML, Fuller SJ, Barden JA, Petrou S, Sluyter R** (2003) An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X<sub>7</sub> receptor. *J Biol Chem* 278:17108-17113.
- Wilkinson GF, Purkiss JR, Boarder MR.** (1994) Differential heterologous and homologous desensitization of two receptors for ATP (P2y purinoceptors and nucleotide receptors) coexisting on endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 45(4):731–736.
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C** (2006): Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science*, 314:664-666.
- Witting A, Chen L, Cudaback E, Straiker A, Walter L, Rickman B, Moller T, Brosnan C, Stella N** (2006) Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6362-6367.
- Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N** (2004) P2X<sub>7</sub> receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3214-3219.
- Woodgett JR.** (1991) cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods Enzymol.* ;200:564–577.
- Woodgett JR.** (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9:2431–2438.
- Wu PY, Lin YC, Chang CL, Lu HT, Chin CH, Hsu TT, Chu D, Sun SH.** (2009) Functional decreases in P2X<sub>7</sub> receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cell Signal.* (6):881-91.
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J.** (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med.* 9(4):453-7.
- Xing M, Post S, Ostrom RS, Samardzija M, Insel PA.** (1999) Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated arachidonic acid release by cyclic AMP defines a negative feedback loop for P2Y receptor activation in Madin-Darby canine kidney D1 cells. *J Biol Chem.* 274(15):10035-8.
- Xu H, Sweeney D, Wang R, Thinakaran G, Lo AC, Sisodia SS, Greengard P, Gandy S** (1997): Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:3748-3752.
- Xu J, Chalimoniuk M, Shu Y, Simonyi A, Sun AY, Gonzalez FA, Weisman GA, Wood WG, Sun GY.** Prostaglandin E<sub>2</sub> production in astrocytes:

- regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;69:437–448.
- Xu J, Weng YI, Simonyi A, Krugh BW, Liao Z, Weisman GA, Sun GY. (2002) Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA2 phosphorylation and arachadonic acid release in primary murine astrocytes. *J Neurochem*. 83:259–270.
- Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K (2005) Animal models for the study of adenosine receptor function. *J Cell Physiol* 202:9-20.
- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ (1997): Cell surface amyloid beta- protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *J Neurosci*, 17:1004-1010.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, et al (1999): Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402:533-537. [SEP]
- Yan R, Munzner JB, Shuck ME, Bienkowski MJ (2001): BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem*, 276:34019-34027.
- Yan, R. y Vassar, R. (2014). Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol* 13, 319-329.
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, et al (2003): Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med*, 9:3-4.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989): [SEP]Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with [SEP]Alzheimer's disease. *Science*, 245:417-420. [SEP]
- Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ (2000): Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:6138-6143.
- Young MT, Pelegrin P, Surprenant A (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol* 71:92-100.
- Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ. (2007) A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci*. 27(52):14459-69.
- Young-Pearse TL, Chen AC, Chang R, Marquez C, Selkoe DJ. (2008 ) Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural Dev*. 3:15.
- Yu C, Nwabuisi-Heath E, Laxton K, Ladu MJ (2010): Endocytic pathways mediating oligomeric Abeta42 neurotoxicity. *Mol Neurodegener*, 5:19.
- Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S (2008) Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res* 1194:45-55.

- Yuskaitis C.J., Jope R.S.,** (2009). Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity. *Cell. Signal.* 21, 264–273.
- Zambon A.C., Hughes R.J., Meszaros J.G., Wu J.J., Torres B., Brunton L.L., Insel P.A.** (2000) P2Y2 receptor of MDCK cells: cloning, expression, and cell-specific signalling. *Am. J. Physiol.* 279:1049–1052.
- Zhang H, Li Z, Viklund EK, Stromblad S** (2002): p21-activated kinase 4 interacts with integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5 and regulates  $\alpha$ v $\beta$ 5-mediated cell migration. *J Cell Biol* 158: 1287–1297
- Zhang Y-W, Thompson R, Zhang H, Xu H** (2011): APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4:3.
- Zhang YW, Wang R, Liu Q, Zhang H, Liao FF, Xu H** (2007): Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:10613-10618.
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, et al** (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 81:525-531. [L]  
[SEP]
- Zhou S, Zhou H, Walian PJ, Jap BK** (2005): CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:7499-7504. [L]  
[SEP]
- Zimmermann H** (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 49:589-618.
- Zimmermann H** (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:299-309.
- Zimmermann H, Mishra SK, Shukla V, Langer D, Gampe K, Grimm I, Delic J, Braun N** (2007) Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An r Acad Nac Farm* 73 (2):1-30.